



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultad de Ciencias

Master en Biología Celular, Molecular y Genética 

Evaluación de la resistencia de tres líneas de pimiento de tipo Padrón frente a *Phytophthora capsici*

Avaliación da resistencia de tres liñas de pemento de tipo Padrón fronte a *Phytophthora capsici*

Evaluation of the resistance of three lines of pepper (Padrón type) against *Phytophthora capsici*



Trabajo de Fin de Máster

Autor: Alexander Carneiro Figueira

Directores: José Díaz Varela y Javier Veloso Freire

Curso 2020/2021

Julio 2021



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



D. JOSÉ DÍAZ VARELA, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, Y D. JAVIER VELOSO FREIRE, CONTRATADO POSTDOCTORAL, DOCTOR EN BIOLOGÍA, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster presentado por el alumno ALEXANDER CARNEIRO FIGUEIRA y titulado:

“Evaluación de la resistencia de tres líneas de pimiento de tipo Padrón frente a *Phytophthora capsici*”

“Avaliación da resistencia de tres liñas de pemento de tipo Padrón fronte a *Phytophthora capsici*”

Evaluation of the resistance of three lines of pepper (Padrón type) against *Phytophthora capsici*”

ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 18 de Julio de 2021.

Fdo. José Díaz Varela

Fdo. Javier Veloso Freire

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 <i>Phytophthora capsici</i>	3
1.2 Programas de mejora en <i>Capsicum annuum</i>	5
1.3 Variedades autóctonas de <i>Capsicum annuum</i>	7
1.4 Interacción planta-patógeno y sistema inmune de la planta.....	8
1.5 Mecanismos de resistencia inducida	10
1.5.1 Lignificación	11
1.5.2 Papilas	11
1.5.3 Fitoalexinas	12
1.5.4 Proteínas PR	13
1.5.5 Respuesta hipersensible (HR) y muerte celular hipersensible (HCD).....	14
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1 Material vegetal.....	15
3.2 <i>Phytophthora capsici</i>	16
3.2.1 Preparación de medios de cultivo.....	16
3.2.2 Mantenimiento de la cepa Pc450.....	16
3.2.3 Obtención del inóculo	16
3.3 Inoculación de las plantas huésped con <i>Phytophthora capsici</i>	17
3.4 Análisis biométrico de los síntomas	17
3.5 Toma y procesado de las muestras	18
3.6 Análisis de expresión de marcadores génicos	19
3.6.1 Extracción de ARN	19
3.6.2 Síntesis de ADN complementario (RT-PCR).....	19
3.6.3 PCR cuantitativa (qPCR).....	20
3.7 Extracción y medida de los fenoles.....	21
3.8 Análisis estadísticos	22
4. RESULTADOS	22
4.1 Evaluación de la infección en las diferentes líneas	22
4.2 Expresión génica relativa los genes de defensa en las diferentes líneas.....	24
4.3 Evaluación de fenoles solubles en las diferentes líneas	26
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS	33
7. BIBLIOGRAFÍA.....	34

RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT

El pimiento tipo Padrón es el cultivar gallego más importante desde el punto de vista agroalimentario, gozando de un gran prestigio a nivel nacional y europeo. En el presente trabajo se ha evaluado la resistencia de tres líneas de pimiento de Padrón, dos líneas puras (Padrón Cambre y Padrón Ramiro Arnedo) y una línea híbrida (Celta Ramiro Arnedo), frente a *Phytophthora capsici*. Los análisis de síntomas confirmaron un mayor valor del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) en la línea Cambre, que difiere significativamente del híbrido Celta. El análisis de la longitud de la necrosis confirmó que la lesión causada por el patógeno fue mayor en las plantas de las líneas de tipo Padrón que en la línea híbrida. Se evaluó la expresión de tres genes relacionados con la resistencia de la planta (*CaPO1*, *CaBPR1* y *CaSC*). Los resultados confirman una mayor expresión de estos genes en el híbrido Celta con respecto a las líneas de tipo Padrón. Probablemente, la mayor resistencia en la línea Celta sea debida a una respuesta más rápida y más fuerte frente a *P. capsici*. El análisis de la expresión del gen *CaACO* reveló un papel poco relevante del etileno en la defensa contra el patógeno en estas líneas.

O pemento tipo Padrón é o cultivar galego de maior importancia desde o punto de vista agroalimentario, gozando dun gran prestixio a nivel nacional e europeo. No presente traballo, avalíouse a resistencia de tres liñas de pemento de Padrón: dúas liñas puras puras (Padrón Cambre e Padrón Ramiro Arnedo) e unha liña híbrida (Celta Ramiro Arnedo), fronte a *Phytophthora capsici*. As análises dos síntomas confirmaron un maior valor de área baixo a curva de progreso da enfermidade (AUDPC) na liña Cambre, que difire significativamente do híbrido Celta. A análise da lonxitude da necrose confirmou que a lesión causada polo patóxeno foi maior nas plantas das liñas de tipo Padrón que na liña híbrida. Avalíouse a expresión de diferentes xenes relacionados coa resistencia da planta (*CaPO1*, *CaBPR1* e *CaSC*). Os resultados confirman unha maior expresión destes xenes na liña Celta con respecto ás liñas de tipo Padrón. Probablemente a maior resistencia da liña Celta sexa debido a unha resposta máis rápida e máis forte fronte ao patóxeno. A análise da expresión do xene *CaACO* revelou un papel pouco relevante do etileno na defensa contra o patóxenos nestas liñas.

Padrón pepper is the most important Galician cultivar in the agri-food industry, which has a great prestige at national and European level. In the present work, the resistance of three lines of pepper (Padrón type), two pure lines (Padrón Cambre and Padrón Ramiro Arnedo) and one hybrid line (Celta Ramiro Arnedo), against *Phytophthora capsici* were assessed. The symptom analyses confirmed a higher Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC) in the

Cambre (Padrón type) line, which differs significantly from the Celta line. Necrosis length analysis confirmed that the lesion caused by the pathogen was higher in plants of the Padrón type lines than in the hybrid line. The expression of genes involved in plant resistance (*CaPO1*, *CaBPR1* and *CaSC*) was assessed. The results confirm a higher expression of these genes in the Celta line compared to the Padrón lines. Probably, the higher resistance in the Celta line is due to a faster and stronger response to *P. capsici*. The analysis of *CaACO* gene expression revealed a minor role of ethylene in the defence against the pathogen in these lines.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Phytophthora capsici*

Las especies del género *Phytophthora* son patógenos de plantas que causan serias enfermedades en importantes cultivos. *Phytophthora* pertenece a un grupo de organismos que se denominan oomicetes. Los oomicetes se engloban en el grupo de los Stramenopiles junto con otros organismos del reino Protista como las algas pardas, las diatomeas y los opalínidos (Adl et al., 2005). De hecho, hoy en día se conoce que los oomicetes tuvieron un origen evolutivo en el mar (Beakes et al., 2012).

Entre los 10 oomicetes más problemáticos en base a su importancia económica y científica, se encuentran 5 especies de *Phytophthora* (Kamoun et al., 2015). Son el género de oomicetes más estudiado debido a su repercusión a nivel global.

En los últimos años se ha incrementado notablemente el número de especies de *Phytophthora* descritas. Este gran aumento se debe al desarrollo de herramientas más sofisticadas para la delimitación de especies y a los censos a gran escala realizados para detectar la presencia de nuevas especies en entornos naturales y agrícolas (Kroon et al., 2012). El género *Phytophthora* se compone actualmente de 123 especies descritas formalmente y, además, existen otras 23 especies provisionales aún sin confirmar (Kang, 2021). Se sabe que todas las especies de este género son potenciales patógenos que causan la podredumbre de diversos tejidos (raíces, hojas, tallos, frutos...) de plantas de importancia agrícola y ornamental (Tyler, 2002).

Las especies del género *Phytophthora* producen mayoritariamente esporas asexuales en unas estructuras especializadas denominadas esporangióforos (Judelson & Blanco, 2005). Existen especies caducas, en las cuales el esporangióforo se desprende y se dispersa lejos gracias a la acción del viento y especies no caducas, en las cuales el esporangióforo permanece adherido a las hifas (Judelson & Blanco, 2005). Cada esporangióforo puede producir en torno a 10-30 zoosporas con dos flagelos para la movilidad en el agua; uno de los cuales es necesario para propulsar a la célula y el otro para controlar la dirección de movimiento (Judelson & Blanco, 2005; Tyler, 2002). Las zoosporas se sienten atraídas por los exudados (aminoácidos, isoflavonoides) liberados por las raíces de las plantas (Judelson & Blanco, 2005; Tyler, 2002). Aparte de la quimiotaxis, las zoosporas experimentan una respuesta de electrotaxis para reconocer los potenciales de membrana de las raíces (Judelson & Blanco, 2005). Estas zoosporas suelen tener una vida corta y rápidamente se diferencian en quistes que se adhieren y terminan germinando para producir hifas (Tyler, 2002). Una vez enquistadas las esporas, se

forma el apresorio y, con la ayuda de la presión mecánica y de las enzimas degradativas, el oomicete consigue romper la epidermis de la raíz y formar el haustorio en la primera célula infectada (Boevink et al., 2020; Judelson & Blanco, 2005).

A medida que las hifas crecen se van estableciendo haustorios en las células (Boevink et al., 2020). Los haustorios están en contacto estrecho con la membrana, produciéndose la liberación de factores de patogenicidad que controlan las defensas de la planta y la absorción de nutrientes. Cuando la infección ha progresado lo suficiente, se producen los esporangióforos. Estas estructuras se producen en las raíces superficiales para permitir la dispersión de las zoosporas por acción de la lluvia (Boevink et al., 2020).

Las especies de *Phytophthora* se suelen clasificar en función de su estrategia de ataque como patógenos hemibiotrofos. En la fase inicial de la infección se comportan como biotrofos, estableciendo el haustorio y manteniendo a las células de la planta vivas. Posteriormente, los patógenos pasan a un modo necrotrofo en el cual provocan necrosis de los tejidos de la planta y se alimenta a partir de esas células muertas (Boevink et al., 2020).

El género *Phytophthora* se puede dividir en 10 clados bien representados. *Phytophthora capsici* (Leonian) se encuentra en el clado 2, junto con las especies *P. glovera*, *P. mexicana* y *P. tropicalis* (Blair et al., 2008). Las especies pertenecientes a este clado se caracterizan por la presencia de zoosporangios papilados o semipapilados y por ser, en su mayoría homotáticos (Kroon et al., 2012). No obstante, *P. capsici* es una especie heterotática (Granke et al., 2012).

Phytophthora capsici (Leonian) fue descrito por primera vez en una plantación de pimientos (*Capsicum annuum*) en Nuevo México, EE.UU. (Leonian, 1922). Esta especie ocupa el puesto número 5 entre los 10 oomicetes patógenos más preocupantes desde el punto de vista económico según Kamoun et al. (2015). Puede infectar a una gran cantidad de plantas en condiciones experimentales, aunque en cultivos se puede observar principalmente en cucurbitáceas y pimiento (Granke et al., 2012).

P. capsici se puede reproducir de manera sexual y asexual (Figura 1). Esta especie sería heterotática, lo cual quiere decir que es necesario el contacto entre los dos tipos de apareamiento para que se produzca la reproducción sexual (Granke et al., 2012). Existen 2 tipos de apareamiento, A1 y A2, y cada tipo de apareamiento produce señales hormonales que inducirán la diferenciación de los gametangios en el tipo opuesto (Granke et al., 2012). El gametangio masculino se denomina anteridio, mientras que el femenino se denomina oogonio y es en estas estructuras donde ocurre la meiosis (Ristaino & Johnston, 1999). El proceso de apareamiento

incluye 3 fases: (i) percepción de los factores de apareamiento, (ii) transición a la producción de los anteridios y oogonios en cada tipo de apareamiento y (iii) crecimiento de los anteridios a través de los oogonios (Lamour et al., 2012). Tras la plasmogamia y la cariogamia, se produce la formación de las oosporas. Estas oosporas tienen la capacidad de permanecer en el suelo en estado de latencia durante la época desfavorable (Granke et al., 2012).

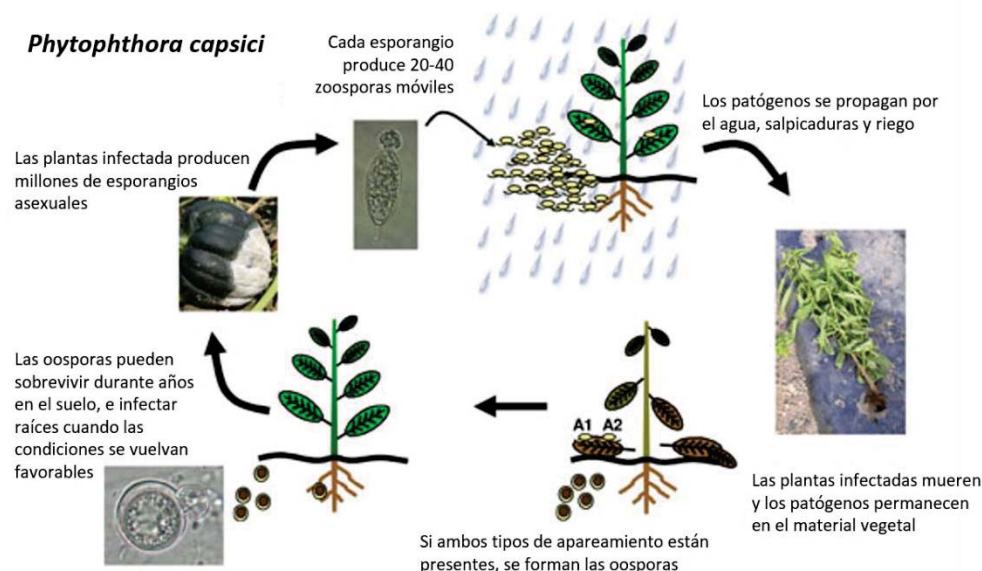


Figura 1. Ciclo vital de *Phytophthora capsici*. Imagen tomada y modificada de <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>

1.2 Programas de mejora en *Capsicum annuum*

Los recursos genéticos de *Capsicum* se han utilizado con éxito en programas de mejoras modernos para el desarrollo y comercialización de diversos tipos de pimientos dulces y picantes. Estos recursos se enfocan en reducir el estrés impuesto por factores bióticos, así como condiciones ambientales extremas (Srivastava & Mangal, 2019).

La estrategia de mejora en *Capsicum annuum* se basa en desarrollar un genotipo único con mayor potencial genético destinado a aumentar la productividad, resistencia a enfermedades y contenido de compuestos bioactivos de las cosechas (Srivastava & Mangal, 2019). No obstante, el principal objetivo de los programas de mejora es el incremento de la resistencia a enfermedades. Dicha mejora comienza con la identificación de fuentes con genotipo silvestre resistentes, seguida de la introgresión en genotipos de interés agroalimentario (cultivares de élite) (Srivastava & Mangal, 2019). La introgresión de genes de resistencia a enfermedades provoca la mejora significativa de los cultivos en términos de rendimiento, calidad y estabilidad de la producción de pimiento (Srivastava & Mangal, 2019).

La mejora de la resistencia a *P. capsici* en *Capsicum annuum* es todo un desafío, ya que el patógeno evoluciona continuamente para superar la resistencia del hospedador y aparecen nuevas cepas más virulentas (Barchenger et al., 2018). Se suelen utilizar como fuente de resistencia contra este patógeno las líneas Serrano Criollo de Morelos-334/331 (SCM334/331), PI201232 y PI201234 (Srivastava & Mangal, 2019). La línea SCM334 se emplea comúnmente como fuente de resistencia, ya que es ampliamente resistente frente a diferentes aislados de *P. capsici* (Srivastava & Mangal, 2019). Sin embargo, en algunos programas de mejoras se prefiere el uso de las variedades PI201232 y PI201234 debido a que SCM334 muestra una menor producción de frutos y pica mucho (Srivastava & Mangal, 2019).

Es difícil introducir resistencia a *P. capsici* en cultivares susceptibles que están bien adaptados. Cuando se emplean métodos clásicos de retrocruzamiento, la resistencia es menor que la del progenitor donante, lo cual se puede deber a la pérdida de genes de resistencia secundaria (Barchenger et al., 2018). La selección recurrente se ha realizado para trasladar la resistencia poligénica a los cultivares de élite. Sin embargo, esta resistencia suele estar ligada con un bajo rendimiento, frutos pequeños y plantas menos vigorosas (Barchenger et al., 2018).

El uso de los métodos clásicos de mejora presenta una serie de limitaciones que dificulta la adopción de cultivares resistentes. El empleo de la tecnología de doble haploide puede ser una forma rápida de fijar genes de resistencia en plantas élite (Popova Irikova et al., 2016). Este método consiste en la hibridación con una planta con altos niveles de resistencia y el desarrollo de líneas dobles haploides de la generación filiar F1, que permite la fijación de la resistencia sin perder rasgos hortícolas importantes (Barchenger et al., 2018). Bajo condiciones de estrés *in vitro*, se puede inducir en las microsporas el cambio de su programa de desarrollo de gametófito hacia la división y proliferación celular, embriogénesis y regeneración de la planta (Popova Irikova et al., 2016). Puede presentar una serie de limitaciones como un elevado coste, necesidad de experiencia en cultivos de tejido, desarrollo de protocolos específicos para cada laboratorio y tasas de éxito bajas (Barchenger et al., 2018).

En la variedad de pimiento SCM334, resistente a *P. capsici*, se han identificado una serie de QTLs como *Phyto-U*, *Phyto 5.2* y *Pc 5.1* limitados al cromosoma 5 que están asociados con la resistencia a este patógeno (Srivastava & Mangal, 2019). El cromosoma 5 es considerado como la principal región involucrada en la respuesta a patógenos y de resistencia a la pudrición de la raíz por *P. capsici* (Parisi et al., 2020).

1.3 Variedades autóctonas de *Capsicum annuum*

En Galicia existen en la actualidad 14 cultivares locales de *Capsicum annuum* L. bien diferenciados (Figura 2), de los cuales se pueden destacar el pimiento de tipo Padrón, tipo Couto, tipo Arnoia, tipo Oímbra, tipo Mougán, tipo Punxín, tipo Piñeira y tipo Blanco Rosal (Rodríguez Bao et al., 2007; Taboada Arias et al., 2017). Líneas pertenecientes a estas 8 variedades autóctonas enumeradas han sido sometidas a un proceso de selección de líneas puras para obtener mejores genotipos y un material de mayor calidad (Rodríguez Bao et al., 2006). Las variedades Couto, Arnoia, Oímbra y Mougán gozan de ser reconocidas como Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) (Taboada Arias et al., 2017). Padrón, Couto y Mougán son cultivares locales de fruto corto y Arnoia y Oímbra de fruto mediano o largo (Rodríguez Bao et al., 2004a).

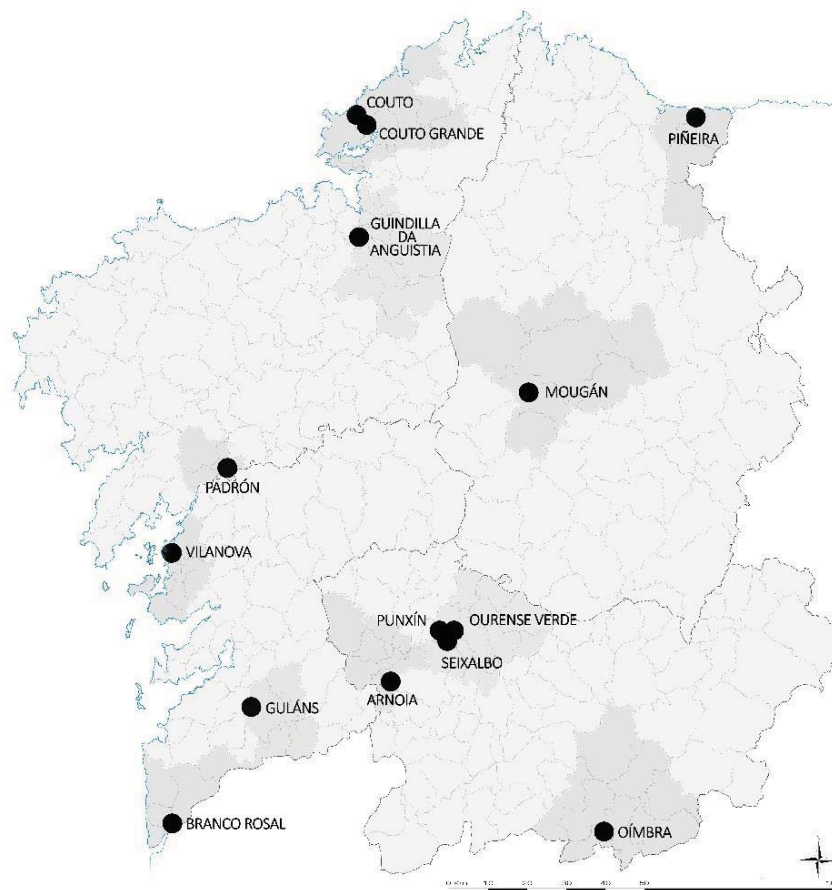


Figura 2. Mapa de Galicia con las diferentes variedades de pimiento cultivadas en la región. La provincia de Ourense cuenta con 5 variedades: Arnoia, Oímbra, Punxín, Ourense Verde y Seixalbo; la provincia de A Coruña presenta 4: Couto, Couto Grande, Guindilla da Angustia y Padrón; la provincia de Pontevedra contiene 3: Vilanova, Guláns y Blanco Rosal y en la provincia de Lugo hay 2: Piñeira y Mougán. El área resaltada en el mapa representa la comarca o localidades de origen de los diferentes cultivares.

De las variedades autóctonas cultivadas en Galicia, el 90% de la superficie cultivada corresponde al tipo Padrón (Rodríguez Bao et al., 2007). El pimiento de Padrón es el cultivar de mayor importancia económica, siendo consumido a nivel nacional y exportado a otros países europeos como Portugal o Alemania (Rodríguez Bao et al., 2004b; Rodríguez Bao et al., 2007). Esta variedad está amparada por la Denominación de Origen Protegida (DOP) Pimiento de Herbón en las zonas de cultivos determinadas en su reglamento (Taboada Arias et al., 2017). Se suele cultivar en invernadero, aunque también es común su cultivo al aire libre (Taboada Arias et al., 2017). La plantación temprana se suele realizar en invernadero en los meses de febrero y marzo y la plantación tardía al aire libre en los meses de abril y mayo (Rodríguez Bao et al., 2007). Presenta un fruto corto semicartilaginoso de color verde en su inmadurez y rojo en estado maduro; suele ser colgante y según su grado de desarrollo puede presentar distintas formas y tallas (Bernal Pita da Veiga, 1993). El fruto se consume inmaduro, debe medir entre 3,5 y 5,5 cm de longitud, tener un peso comprendido entre 3,5 y 4,5 g, el pedúnculo debe medir entre 3,5 y 6 cm y poseer un diámetro en la base del fruto de 1,5 a 2 cm (Reglamento (CE) nº 510/2006 del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, sobre la protección de las IG y las DO de los productos agrícolas y alimenticios). Tiene un sabor dulce, pudiendo resultar picante (contiene capsicina) (Taboada Arias et al., 2017).

1.4 Interacción planta-patógeno y sistema inmune de la planta

La habilidad de detectar y de poder defenderse de potenciales organismos patógenos fue fundamental en el éxito evolutivo de las plantas superiores (Chisholm et al., 2006). Las plantas han desarrollado dos estrategias fundamentales para reconocer a los patógenos: la inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos o a daños en la planta (PTI) y la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Dodds & Rathjen, 2010).

La PTI es la primera línea de defensa de la planta (De Wit, 2007). En la membrana plasmática de las células de las plantas, se encuentran una serie de receptores que se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Zipfel, 2014). Los PRRs pueden reconocer moléculas de diferente naturaleza (carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos...) asociados a un amplio rango de patógenos (Andersen et al., 2018). Estas moléculas se suelen denominar como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y suelen ser componentes esenciales y ampliamente distribuidos en los diferentes tipos de patógenos como la flagelina de las bacterias o la quitina de los hongos (Dodds & Rathjen, 2010). Por otra parte, los PRRs también pueden reconocer moléculas de la propia planta que se liberan como consecuencia de la interacción con el patógeno o de un daño celular producido por el patógeno (Macho & Zipfel, 2014). Este sería

el caso los ácidos oligogalacturónicos que se producen debido a la acción de las enzimas degradativas de la pectina liberadas por hongos y oomicetes, siendo los receptores (PRRs) de esos oligogalacturónidos WAK1 y WAK2 (Andersen et al., 2018).

No obstante, los patógenos pueden suprimir esta primera línea de defensa de la planta evitando el reconocimiento por parte de los PRRs o sintetizando otras moléculas elicitoras que se conocen como efectores (Chisholm et al., 2006; Dangl et al., 2013). La liberación de estos efectores en la planta suprime la PTI en la planta. Es aquí donde entra en juego la segunda línea de defensa de las plantas que se denomina inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Yuan et al., 2021). Las proteínas encargadas de reconocer a estos efectores se conocen como proteínas R o NLR. Las proteínas R suelen ser proteínas citoplasmáticas con repeticiones ricas en leucinas de unión a nucleótidos en el extremo carboxilo terminal (Zipfel, 2014). El reconocimiento del efector por su correspondiente proteína R raramente se produce de forma directa, mediante la unión del efector al receptor (modelo receptor ligando), siendo más habitual el reconocimiento de forma indirecta (Dodds & Rathjen, 2010). Los métodos de reconocimiento indirecto se dividen en dos modelos: modelo de hipótesis de guardia y modelo de señuelo (Dodds & Rathjen, 2010). La hipótesis de guardia sostiene que existen proteínas de la planta que participan en la señalización de la PTI y que son susceptibles de sufrir modificaciones por los efectores de los patógenos de forma que esas modificaciones son reconocidas por las proteínas R (Rafiqi et al., 2009). El modelo de señuelo sería una variación del anterior modelo en el cual, diversas proteínas de la célula actúan como dianas alternativas del efector y cuyas modificaciones también son detectadas por las proteínas R (Van Der Hoorn & Kamoun, 2008).

Los patógenos del género *Phytophthora* poseen multitud de efectores que promueven la virulencia en la planta huésped. La acción de estos efectores produce cambios en el contenido de ácido salicílico, calosa y peróxido de hidrógeno que favorecerá la infección de la planta por estos oomicetes (Wang & Jiao, 2019)

Jones & Dangl (2006) propusieron el modelo de zig-zag para describir el mecanismo fisiológico de los dos tipos de inmunidad de las plantas cuando se produce la interacción con el patógeno (Yuan et al., 2021). El modelo de zig-zag se puede representar en cuatro fases (Figura 3). En la fase 1, las PRRs de las plantas son capaces de reconocer a los PAMPs de los patógenos y desencadenar la PTI, deteniendo así la infección. En la fase 2, los patógenos exitosos que superaron la anterior fase, liberan efectores en el interior de las células vegetales favoreciendo la virulencia, lo que resulta en la susceptibilidad activada por efectores (ETS). En la fase 3, las

proteínas R detectan a los efectores desencadenando la ETI, dando como resultado la resistencia a la enfermedad. En la fase 4, la selección natural favorece la diversificación del gen efector o la adquisición de nuevos efectores por parte del patógenos que supriman la ETI (Jones & Dangl, 2006).

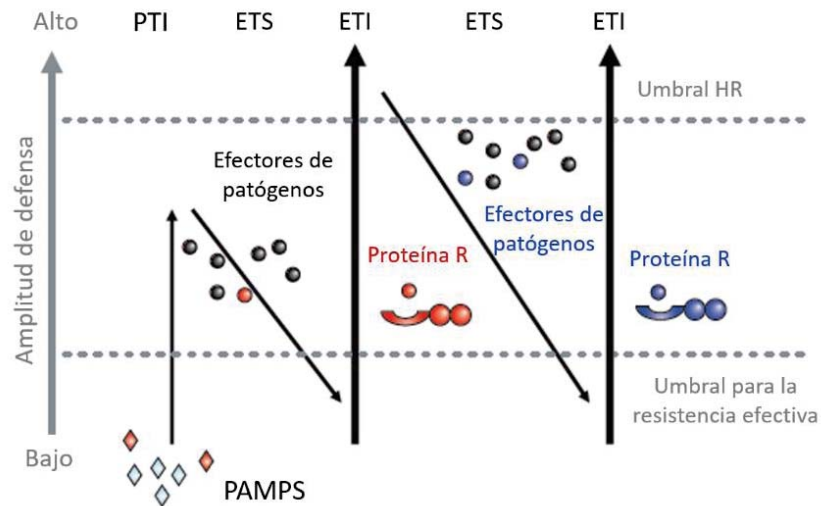


Figura 3. Modelo de zig-zag propuesto para ilustrar los mecanismos de sistema inmune que posee la planta. Imagen tomada y modificada de Jones & Dangl (2006).

1.5 Mecanismos de resistencia inducida

Las defensas de las plantas comprenden una serie de mecanismos preexistentes o pasivos que incluyen aspectos fenotípicos de la propia planta como el grosor de la cutícula y la presencia de compuestos químicos de expresión constitutiva como las fitoanticipinas o las saponinas (Walters, 2011). Por otro lado, las plantas también cuentan con una serie de mecanismos de resistencia inducida que se expresan tras el contacto con el patógeno (Walters et al., 2014).

Muchas de las respuestas de defensa de la planta son activadas tanto por la PTI como por la ETI tras el reconocimiento del patógeno (Buchanan et al., 2015). Independientemente de cual sea la molécula elicitora (PAMP o efector) reconocida por la planta, se generan defensas activas o inducibles que van a conferir resistencia en la planta (Buchanan et al., 2015). El éxito de este tipo de defensa contra un patógeno parece ser que está determinado por la rapidez con la cual estos mecanismos de defensa son activados o expresados, y por su efectividad contra patógenos con diferentes modos de ataque (Walters, 2011). Los mecanismos de defensa inducida pueden ser estructurales y químicos (Walters, 2011).

Las defensas estructurales inducidas tienen como finalidad el reforzamiento de la pared para evitar la entrada del patógeno. Las defensas más comunes de este tipo son la lignificación y la

formación de papilas en el sitio de infección (Walters, 2011). El otro tipo de defensa inducida frente al estrés biótico serían las defensas químicas. Este tipo de defensa implica la producción de sustancias químicas que funcionan ejerciendo un efecto tóxico sobre los patógenos o contrarrestando el efecto de las toxinas de los patógenos (Shittu, 2019). Las defensas químicas más destacadas son la producción de fitoalexinas, proteínas PR y la respuesta/muestra celular hipersensible (Walters, 2011).

1.5.1 Lignificación

La lignificación y la expresión de genes que controlan la síntesis de la lignina son procesos ampliamente descritos tras el ataque de los patógenos (Xie et al., 2018).

Los polímeros de lignina se componen principalmente de 3 monómeros de naturaleza fenólica (monolignoles) que son los alcoholes p-cumaril M1H, coniferil M1G y sinapil M1S (Boerjan et al., 2003). Cuando estos monolignoles se incorporan al heteropolímero de lignina producen, respectivamente, p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S) (Boerjan et al., 2003). Estos monómeros se producen por la ruta fenilpropanoide (Sattler & Funnell-Harris, 2013). Por esta ruta metabólica se producen otros compuestos fenólicos aparte de los monolignoles, como serían las fitoalexinas fenólicas, estilbenos, cumarinas y flavonoides, de los cuales algunos están implicados en la defensa de las plantas (Sattler & Funnell-Harris, 2013). Las peroxidasas de clase III y lacasas son enzimas que están involucradas en la polimerización de los monolignoles para formar la lignina en las paredes celulares de las plantas (Xie et al., 2018).

Cuando la lignina se deposita en respuesta a una infección se denomina lignina de defensa y tiene una composición diferente a la lignina depositada durante el desarrollo de la planta. La lignina de defensa tiene mayor proporción en el monolignol p-hidroxifenil en comparación con la lignina estructural (Sattler & Funnell-Harris, 2013).

La lignina puede contribuir a la resistencia de la planta de distintas formas. En primera instancia, la deposición de la lignina en las paredes celulares favorece una mayor resistencia frente a la presión mecánica ejercida durante la formación del apresorio de los hongos u oomicetes (Hückelhoven, 2008). Además, las paredes celulares lignificadas pueden suponer una barrera impidiendo la libre circulación de los nutrientes hacia el patógeno (Sticher et al., 1997).

1.5.2 Papilas

Las papilas son otro tipo de defensas estructurales inducibles. Las plantas pueden reforzar las paredes celulares en respuesta a una infección mediante la formación de estas deposiciones en

la pared celular (Walters et al., 2014). Está bastante generalizada la idea que la papila ralentiza la invasión del patógeno, produciéndose una ganancia de tiempo que permitirá la inducción de respuestas de defensas adicionales que requieren activación de la expresión génica (Voigt, 2014). La formación de la papila sería una respuesta local que, gracias a los componentes estructurales que se depositan en la pared, se produce una resistencia a la fuerza mecánica ejercida por los hongos u oomicetes (Hückelhoven, 2014).

La composición bioquímica de las papilas parece variar entre las distintas especies vegetales, pero los compuestos más comunes encontrados en estas estructuras son: calosa, fenoles, fenoles conjugados, lignina, especies reactivas de oxígeno, proteínas estructurales de la pared celular, pectinas y xiloglucanos (Underwood, 2012). A pesar de las diferencias en la composición de las papilas, el compuesto que se encuentra de forma ubicua en todas las plantas es la calosa, un polímero de β -1,3-glucano (Underwood, 2012). La función de este polímero en la papila ha sido muy discutida, ya que algunos mutantes de *Arabidopsis* que no expresaban calosa, mostraban un incremento de la resistencia frente al patógeno (Voigt, 2014).

1.5.3 Fitoalexinas

Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular que se producen en los tejidos de plantas superiores sanas en cantidades insignificantes en respuesta a una infección bacteriana o fúngica (Bizuneh, 2021). Tienden a acumularse en el lugar de infección (Bizuneh, 2021). La mayoría de las fitoalexinas conocidas son tóxicas e inhiben el crecimiento de hongos y oomicetes patógenos, pero algunas también resultan tóxicas para bacterias e incluso para plagas como nemátodos e insectos (Bizuneh, 2021; Jeandet et al., 2013). No obstante, los patógenos más virulentos pueden desarrollar cierta resistencia a estos compuestos mediante la destoxificación de las fitoalexinas, usando bombas de salida de fitoalexinas o liberando efectores en la planta que inhiban su síntesis (Walters et al., 2014).

Las fitoalexinas se pueden clasificar según su naturaleza química en: fenoles, terpenoides, furanoacetilenos, compuestos que contienen azufre e indoles. La estructura de las fitoalexinas va a depender del tipo de planta que la sintetice y, parcialmente, de la molécula elicitora que induzca su síntesis (Jeandet, 2015).

El capsidiol (Figura 4) es una fitoalexina que ha sido aislada en diferentes especies de solanáceas como el fruto del pimiento (*Capsicum annuum*) y la planta de tabaco (*Nicotina tabacum*) (Ahuja et al., 2012). El capsidiol es un sesquiterpeno bicíclico que previene la

germinación de esporas e inhibe el crecimiento de varias especies de hongos y oomicetes patógenos (Ahuja et al., 2012).

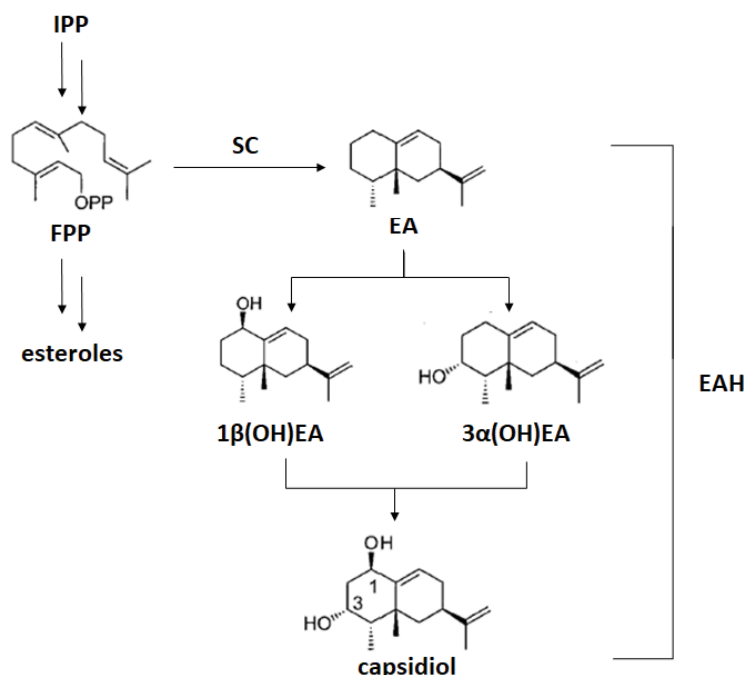


Figura 4. Ruta de biosíntesis de la fitoalexina capsidiol. IPP, pirofosfato de isopentenilo; FPP, pirofosfato de farnesil, SC, sesquiterpeno ciclasa; EA, 5-epiaristoloueno; EAH, 5-epi-aristoloueno hidroxilasa. Imagen tomada y modificada de Takahashi et al. (2005).

1.5.4 Proteínas PR

Las proteínas que se producen como consecuencia del ataque de un patógeno se denominan proteínas PR (*pathogenesis-related proteins*) (Shittu, 2019). La producción de proteínas PR es el principal cambio cuantitativo a nivel local que se produce a nivel proteómico tras el contacto con el patógeno (Mishra et al., 2012). Algunas de las proteínas PR muestran actividad antimicrobiana *in vitro* y su acumulación en la planta está relacionada con las respuestas de resistencia de la planta (Sels et al., 2008).

Las diferentes familias de proteínas PR se definieron por la secuencia del primer miembro de cada familia en ser identificado y fueron numeradas según el orden en el que se descubrieron (Van Loon et al., 2006). Hasta la fecha se han descrito 17 familias (Tabla 1).

No todas las proteínas PR se encuentran en las diferentes especies vegetales y la presencia y las propiedades dentro de los diferentes miembros dentro de una familia pueden diferir mucho (Van Loon et al., 2006). No obstante, las proteínas de la familia PR-1 está ampliamente conservada entre las diferentes especies de plantas. Todas las proteínas PR-1 constan de una estructura

terciaria compuesta de 4 hélices α y 4 láminas β que comparten una serie de residuos estrictamente conservados (Mishra et al., 2012). La proteína PR-1 está involucrada directamente en la defensa contra los oomicetos al interactuar con su membrana plasmática e inhibir su crecimiento mediante la unión y el secuestro de esteroides de membrana de los patógenos (Breen et al., 2017).

Tabla 1. Resumen de las principales funciones de las familias de proteínas PR. Modificado de Mishra et al. (2012).

Familia de proteína	Actividad de la proteína	Componentes o sitios diana del patógeno
PR-1	Unión a esteroides	Membrana de oomicetos
PR-2	1,3- β -glucanasa	Glucano de la pared celular
PR-3	Endoquitinasa	Quitina de la pared celular
PR-4	Endoquitinasa	Quitina de la pared celular
PR-5	Osmotina	Membrana del hongo
PR-6	Inhibidor de proteasas	Proteasas
PR-7	Endoproteasa	Proteínas
PR-8	Endoquitinasa	Quitina de la pared celular
PR-9	Peroxidasa	Lignificación de la pared celular de la planta
PR-10	Ribonucleasa	ARN del patógeno
PR-11	Endoquitinasa	Quitina de la pared celular
PR-12	Defensina	Membrana del patógeno
PR-13	Tionina	Membrana del hongo
PR-14	Proteína de transferencia de lípidos	Membrana del patógeno
PR-15	Oxalato oxidasa	Generación de peróxido
PR-16	Parecida a la oxalato oxidasa	Generación de peróxido
PR-17	Desconocida	Desconocidos

1.5.5 Respuesta hipersensible (HR) y muerte celular hipersensible (HCD)

La respuesta hipersensible (HR) es un tipo de muerte celular programada que se da en plantas resistentes que están siendo atacadas por un patógeno no virulento (Walters, 2011). Este término es usado en la literatura científica para describir el proceso desencadenado durante un interacción incompatible (aquella en la que no se produce enfermedad), pero cuando nos queremos referir al suicidio celular de la planta huésped se utiliza el término muerte celular hipersensible (HCD) (Walters et al., 2014).

El estallido oxidativo que origina la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno suele ocurrir de forma temprana en la respuesta de defensa y suele ser importante para la iniciación de la HR y la HCD (Balint-Kurti, 2019).

Una de las funciones propuestas de la HR y HCD es la limitación del crecimiento y propagación del patógeno, matando a las células infectadas antes de que se produzca la exitosa multiplicación del patógeno (Pontier et al., 1998). Este tipo de defensa contribuye a la resistencia contra patógenos biotrofos, impidiendo su alimentación y propagación hacia tejidos sanos de la planta (Walters et al., 2014). De esta forma, el haustorio del patógeno y la célula infectada mueren al mismo tiempo (Pontier et al., 1998). En el caso de los necrotrofos, esta respuesta sería menos efectiva, ya que necesitan el tejido muerto del hospedador para completar su ciclo (Balint-Kurti, 2019). En el caso de los hemibiotrofos que muestran inicialmente un estilo de vida biotrofo y luego cambian a uno necrotrofo, la HR sería efectiva solo al principio de la infección (Balint-Kurti, 2019).

La HR y HDC están involucradas en la resistencia local al activar mecanismos de defensa en el área necrótica y en el tejido adyacente. La activación de estas defensas incluye la expresión de genes codificantes de proteínas PR y enzimas que conducirían a la formación de fitoalexinas y síntesis de lignina (Pontier et al., 1998).

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos del presente estudio son:

- Determinar el grado de susceptibilidad o resistencia de las tres líneas de pimiento tipo Padrón (Padrón Cambre, Padrón Ramiro Arnedo y el híbrido Celta Ramiro Arnedo), frente al patógeno *Phytophthora capsici*.
- Comprender mediante análisis moleculares y bioquímicos, los mecanismos que pueden explicar la resistencia o susceptibilidad de los cultivares.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Las plantas empleadas en este trabajo fueron obtenidas de un vivero local (A Agraria, Cambre). En este trabajo se emplearon dos líneas puras de pimiento de Padrón, una de ellas es comercializada por Ramiro Arnedo y la otra es una línea local del propio vivero. Además, también se obtuvo de este vivero una variedad híbrida de pimiento de Padrón denominada Celta cuya semilla es comercializada por Ramiro Arnedo. Dichas plantas fueron compradas en estado

fenológico de 7-8 hojas verdaderas y fueron mantenidas en el invernadero en el mes de abril de 2021, añadiéndole agua cuando era necesario, previamente a su uso en los experimentos.

3.2 *Phytophthora capsici*

3.2.1 Preparación de medios de cultivo

3.2.1.1 Medio de cultivo PDA

El medio de cultivo PDA se obtuvo mezclando en un matraz de Erlenmeyer 19,5 g de PDA (Patata Dextrosa Agar) comercial en 500 ml de agua destilada. Se esterilizó en el autoclave y se vertió en placas de cultivo en condiciones estériles.

3.2.1.2 Medio de cultivo V8 Agar

Se calentaron 100 ml de la sopa comercial V8 (compuesta de 8 hortalizas). Seguidamente se trituró la sopa caliente durante 10 minutos, añadiendo agua destilada de forma continua. A continuación, se añadieron 7,5 g de agar y 1 g de CaCO_3 . Se continuó mezclando para homogenizar el preparado. La mezcla se vertió en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml y se llevó al autoclave para su esterilización. Finalmente, una vez atemperada la mezcla, se vertió en placas de Petri en condiciones estériles.

3.2.2 Mantenimiento de la cepa Pc450

Para el mantenimiento de la cepa Pc450 de *Phytophthora capsici* (Leonian) se utilizó el medio de cultivo PDA. Las hifas de este oomicete crecen de forma centrífuga hasta cubrir todo el medio de cultivo. En el momento que esto ocurrió, se realizó el pase a un nuevo medio PDA. El procedimiento consistió en cortar secciones de aproximadamente 1 cm² en la placa totalmente cubierta con la ayuda de una lanceta y disponer dicha sección en el centro de la nueva placa, de forma que el micelio quedase en contacto con el medio de cultivo.

3.2.3 Obtención del inóculo

Para este paso, se dispuso una sección de micelio de aproximadamente 1 cm² en una placa de medio de cultivo V8 Agar, de forma que el micelio quedase en contacto con el medio. Transcurridos 4-5 días, el micelio ya se había expandido de forma centrífuga por toda la placa. Se seccionó cada mitad de la placa con la ayuda de una lanceta y se introdujo los fragmentos en un matraz de Erlenmeyer de 100 ml que contenía 25 ml de una disolución de KNO_3 a una concentración de 1 mg/ml. Los matraces con el micelio de *P. capsici* se dejaron en agitación constante durante 4 días a temperatura ambiente. El paso de un medio rico en nutrientes, como es el caso del medio V8 Agar a un medio pobre en nutrientes, como es el caso de la solución de KNO_3 , favorece la producción de esporangios en *P. capsici*. Tras este período de incubación,

se incubaron los matraces durante 1 hora a 4°C y luego durante 1 hora a temperatura ambiente para favorecer la liberación de las zoosporas de los esporangios. Una vez aplicado el tratamiento, se vertió la solución contenida en el matraz en un embudo con una gasa previamente esterilizados, de forma que la solución filtrada contenga solamente las zoosporas.

3.3 Inoculación de las plantas huésped con *Phytophthora capsici*

Tras la obtención del filtrado, en primer lugar, se comprobó la movilidad de las zoosporas. Se introdujeron 20 µl del filtrado obtenido con la ayuda de una pipeta en la cámara de Malassez y se observó el estado de las zoosporas en el microscopio. Tras esta comprobación, se tomó una muestra de 500 µl y se dispuso en un microtubo de 1,5 ml. Luego se llevó al vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos para enquistar las zoosporas. Se introdujeron 20 µl del filtrado enquistado en la cámara de Malassez y se procedió a realizar el recuento. Una vez realizado el recuento, se calculó la concentración de zoosporas y se diluyó el filtrado inicial en agua destilada, de tal forma que se obtuvo el inóculo a una concentración de 10^3 esporas/ml.

Posteriormente, se llevó el inóculo al invernadero y se aplicaron 5 ml en el cuello de cada planta. Se homogenizaba el inóculo en todo momento. Las plantas fueron previamente encharcadas para favorecer la inoculación. Se realizaron dos experimentos independientes.

3.4 Análisis biométrico de los síntomas

Para la evaluación de los síntomas en el invernadero se siguieron cuatro parámetros principales: turgencia de las hojas en la parte aérea (Tabla 2), lesión del tallo (Tabla 3), muerte de la planta y la longitud de la lesión necrótica del tallo. La toma de los datos se realizó desde el momento en el que se empezaron a observar los primeros síntomas de las plantas hasta que se cumplió el décimo día post-inoculación para cada uno de los 2 experimentos.

Tabla 2. Criterio seguido para clasificar la turgencia de las hojas en la parte aérea de las plantas inoculadas.

Rango	Descripción
0	Ninguna de las hojas muestran pérdida de turgencia
1	Algunas de las hojas muestran pérdida de turgencia
2	Todas o casi todas las hojas muestran pérdida de turgencia
3	Todas las hojas muestran una pérdida de turgencia severa
4	Algunas hojas secas
5	Todas las hojas secas

Tabla 3. Criterio seguido para clasificar la lesión en el tallo de las plantas inoculadas.

Rango	Descripción
0	La lesión todavía no se ha producido
1	La lesión no llega al primer entrenudo
2	La lesión alcanza el primer entrenudo
3	La lesión sobrepasa el primer entrenudo

Los valores obtenidos aplicando los criterios de la tabla 2 y 3 se sumaron, y se les sumo 1 punto adicional si la planta estaba completamente muerta, obteniéndose así la severidad global de la enfermedad en cada planta. Esta severidad se analizó respecto al tiempo tras la inoculación para obtener los valores de AUDPC, siglas en inglés de área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Este valor se calcula conforme a la siguiente fórmula (Campbell & Madden, 1990):

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde y_i representa el valor de severidad para la observación i , t_i es el número de días después de la inoculación en el momento de la observación número i , y n es el número de observaciones.

3.5 Toma y procesamiento de las muestras

Para cada uno de los experimentos, se tomaron muestras de raíz de 4 plantas inoculadas y sin inocular de cada variedad de pimiento a las 24 horas post-inoculación. Las muestras se pesaron, se guardaron en tubos de plástico debidamente etiquetados y se conservan a -80°C hasta el momento de realizar el procesamiento de las muestras.

Posteriormente, fue necesario realizar el procesamiento de la muestra. Para este paso se necesitó un mortero y nitrógeno líquido para pulverizar la muestra de raíz en fragmentos pequeños, de forma que se facilitó el posterior análisis de la muestra. Este paso se debe realizar en frío para evitar que se degraden moléculas lábiles como el ARN. El material vegetal pulverizado de cada muestra fue alicuotado en microtubos de 1,5 ml. Los microtubos se conservaron a -80°C hasta el momento de realizar los análisis correspondientes.

3.6 Análisis de expresión de marcadores génicos

3.6.1 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se usó el *kit* comercial *E.Z.N.A.[®] Plant RNA Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo descrito a continuación sirve para la extracción de ARN de tejidos subterráneos de plantas. A cada muestra de 100 mg de raíz congelada contenida en los microtubos de 1,5 ml, se añadió 500 µl de tampón RB y 10 µl de β-mercaptoetanol. Se homogenizó bien la muestra en el vórtex a máxima velocidad en 2 tandas de 30 segundos. Se aseguró de que la muestra estaba bien lisada y que no quedaban grumos. Se introdujo la columna *Homogenizer Mini Column* en un tubo de recogida de 2 ml. Se pasó el lisado a la columna y se centrifugó a 14000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se descartó la columna y se transfirió el lisado a un microtubo de 1,5 ml procurando no transferir el *pellet* del fondo del tubo. Posteriormente se añadió 500 µl de etanol, se lleva al vórtex a máxima velocidad durante 20 segundos y se pipetea la muestra arriba y abajo para disolver el precipitado (ARN).

Se insertó la columna *HiBind[®] RNA Mini Column* en un tubo de recogida de 2 ml, se transfirió la muestra, se centrifugó a 12000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente y se descartó el filtrado del tubo colector. Luego se añadió 500 µl de *RNA Wash Buffer I* a la columna, se centrifugó a 10000 x g durante 30 segundos y se descartó el filtrado y el tubo de recogida. La columna se transfirió a un nuevo tubo de recogida. Se añadió a la columna 700 µl de *RNA Wash Buffer II*, se centrifugó a 10000 x g y se descartó el filtrado. Luego se repitió este paso, pero añadiendo 500 µl de *RNA Wash Buffer II*. Posteriormente, se centrifugó la columna vacía a máxima velocidad durante 2 minutos para secar la columna con la finalidad de eliminar los restos de etanol que pudiesen interferir en el proceso de amplificación.

Por último, se transfirió la columna *HiBind[®] RNA Mini Column* a un microtubo de 1,5 ml, se añadió 60 µl de agua libre de nucleasas y se dejó reposar durante 1 minuto. Luego se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto y se almacenó el ARN eluído a -80°C.

3.6.2 Síntesis de ADN complementario (RT-PCR)

Se empleó para este procedimiento el *kit* comercial *qScript[®] cDNA Synthesis Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente es necesario realizar la cuantificación del RNA extraído de las muestras en el espectrofotómetro.

La retrotranscripción se realizó en microtubos de PCR de 0,2 ml en un volumen final de 20 µl. En cada microtubo se introdujo el volumen correspondiente a 1 µg de ARN y se completó con

agua triple destilada hasta obtener un volumen de 15 µl. Luego se añadió 4 µl de *qScript Reaction Mix (5X)* (solución concentrada de tampón optimizado, magnesio, oligo(dT), cebadores aleatorios y dNTPs) y 1 µl *qScriptRT* (transcriptasa inversa). La mezcla de cada microtubo se homogenizó en el vórtex y se centrifugó durante 10 segundos para que el contenido baje al fondo del tubo. Se introdujo los tubos en el termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo a 22°C durante 5 minutos (unión de los oligo(dT) al ARNm), 1 ciclo a 42°C durante 30 minutos (transcripción inversa) y 1 ciclo a 85°C durante 5 minutos (desnaturalización de la transcriptasa inversa). Luego se mantuvo a 4°C.

3.6.3 PCR cuantitativa (qPCR)

Las muestras de ADN complementario (ADNc) fueron llevadas a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña. Las muestras de ADNc fueron analizadas en el *Bio-Rad iCyclerTM iQ System*. En cada muestra se realizó la cuantificación de 4 genes marcadores de la patogénesis: *CaBPR1*, *CaPO1*, *CaSC1* y *CaACO* (Tabla 4). Se usó como gen de referencia el gen de expresión constitutiva de actina (Tabla 4). La mezcla de la reacción de la qPCR se compone de *Bio-Rad 1x iQ SYBR Green Supermix*, 0,3 µM de cada primer y 2,5 µl de ADNc para un volumen final de 50 µL. El programa de la PCR consta de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y un paso final a 72°C durante 5 minutos.

Tabla 4. Cebadores empleados en la PCR cuantitativa para determinar los niveles de RNA de los 4 genes relacionados con la patogénesis: *CaPO1*, *CaBPR1*, *CaACO* y *CaSC*. El gen *CaACT* fue empleado como gen de referencia.

Gen	Nº de acceso	Referencia	Nombre cebador	Secuencia cebador	Amplificación
<i>CaATC</i>	AY572427	Silvar et al. (2008)	<i>CaACTFW</i>	5' ATCCCTCCACCTCTTCACTCTC 3'	128 pb
			<i>CaACTRV</i>	5' GCCTTAACCATTCTGTTCATTATC 3'	
<i>CaPO1</i>	AF442386	García et al. (2015)	<i>CaPO1FW</i>	5' ACACTGGAAGCGTGAACAAT 3'	333 pb
			<i>CaPO1RV</i>	5' CAGCTTGCGCTAACATGAAC 3'	
<i>CaBPR1</i>	AF053343	Gayoso et al. (2007)	<i>CaBPR1FW</i>	5' GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT 3'	301 pb
			<i>CaBPR1RV</i>	5' CAAGCAATTATTAAACGATCCA 3'	
<i>CaACO</i>	AJ011109	García (2018)	<i>CaACOFW</i>	5' CGCCACTCCATTGTG 3'	152 pb
			<i>CaACORV</i>	5' TAGATTACTGCATCGCTTCC 3'	
<i>CaSC</i>	AF061285	Silvar et al. (2008)	<i>CaSCFW</i>	5' GCCTCCTGCTTCTGAATACC 3'	312 pb
			<i>CaSCRV</i>	5' TTAATATCCTTCCATCCCGACTC 3'	

El análisis de los datos se realizó con el *software* CFX Maestro suministrado por el fabricante. La expresión relativa de los diferentes genes marcadores para cada variedad de pimiento fue obtenida mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). La expresión relativa se obtuvo aplicando la siguiente ecuación. Como control se utilizaron los valores de Ct de la línea Padrón Ramiro Arnedo sin inocular.

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E_{\text{Diana}}^{\Delta C_{t\text{Diana}}(\text{control-muestra})}}{E_{\text{Referencia}}^{\Delta C_{t\text{Referencia}}(\text{control-muestra})}}$$

Para el cálculo de las eficiencias, se realizó una dilución de la muestra utilizada para el análisis de expresión. Al representar los Ct en el eje de ordenadas y el logaritmo decimal de la concentración en el eje de abscisas, se obtuvo una recta de regresión de pendiente negativa. La eficiencia de amplificación se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

3.7 Extracción y medida de los fenoles

Se tomó un tubo de cada muestra con aproximadamente 600 mg de raíz pulverizada. Se realizó una extracción doble, lo cual quiere decir que se realizaron un total 2 incubaciones. Una primera incubación se realizó con metanol puro al 100%. Se añadió 1 ml de metanol puro a cada muestra. Se agitó la muestra de forma vigorosa para homogenizarla. Posteriormente se llevaron los microtubos al termobloque precalentado a 70°C durante 5 minutos. Transcurrida esta incubación, se centrifugaron los tubos a 20000 x g durante 1 minuto. Luego se retiró el sobrenadante y se depositó en un nuevo microtubo. Se volvió a realizar una segunda incubación con metanol puro repitiendo los mismos pasos. Por último, se realizaron dos centrifugaciones con la finalidad de recoger el máximo sobrenadante posible.

Tras la extracción de los fenoles de la muestra, se prepararon varios microtubos. La medida de los fenoles se realizó siguiendo el protocolo descrito por Singleton & Rossi (1965). Las réplicas de cada muestra se realizaron añadiendo 50 µl de muestra a cada tubo. Luego se añadieron 750 µl de H₂O destilada, y a continuación 50 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se homogenizó bien la mezcla y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 3 minutos. Tras ello, se añadieron 150 µl de Na₂CO₃ al 20%, se agita el tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El blanco se realizó añadiendo los mismos reactivos, pero cambiando los 50 µl de muestra por metanol al 80%. Se ajustó la absorbancia a 0 en espectrofotómetro con el blanco y se midió la absorbancia de los tubos a 760 nm.

Para calcular la concentración de fenoles comprendida en cada muestra, fue necesario realizar una recta patrón donde se midió la absorbancia a 760 nm de diferentes concentraciones conocidas de ácido gálico (compuesto fenólico).

3.8 Análisis estadísticos

Los análisis de las biometrías se realizaron en Statgraphics 19 aplicando la prueba de Kruskal-Wallis. Se tuvo que recurrir a esta prueba no paramétrica, ya que no se cumplían las condiciones de distribución normal de los datos y/o homogeneidad de las varianzas. Posteriormente se aplicó la prueba de Bonferroni para comparar las variedades dos a dos.

Para comparar la expresión relativa de cada uno de los genes entre las diferentes muestras se empleó la prueba ANOVA de dos vías, ya que se tuvo en cuenta dos variables a la hora de determinar diferencias significativas, la variedad y la inoculación. Para comparar dos a dos entre las diferentes variedades se usó la prueba de múltiples rangos de Student-Newman-Keuls. Para comparar los niveles de fenoles contenidos en las diferentes muestras se han aplicado las mismas pruebas estadísticas. Ambos estadísticos fueron realizados en Statgraphics 19.

El nivel de significación para las distintas pruebas es $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación de la infección en las diferentes líneas

Con la finalidad de comprobar la resistencia o susceptibilidad de las diferentes líneas de *Capsicum annuum* al patógeno *Phytophthora capsici*, se analizaron la severidad y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) al décimo día tras la inoculación (Figura 5). En la figura 5a se observa el progreso de la severidad de los síntomas (podredumbre del tallo, marchitez de las hojas y muerte de la planta) a lo largo de los días. El valor de AUDPC a los 10 días que se representa en la figura 5b sería el área comprendida bajo esas curvas. Al día 10 post-inoculación se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes líneas, produciéndose esa diferencia entre el AUDPC de la línea tipo Padrón de Cambre y la línea comercial Celta Arnedo (5b). La línea Padrón comercializada por Ramiro Arnedo no se diferencia significativamente de las otras dos, aunque muestre un valor de AUDPC intermedio.

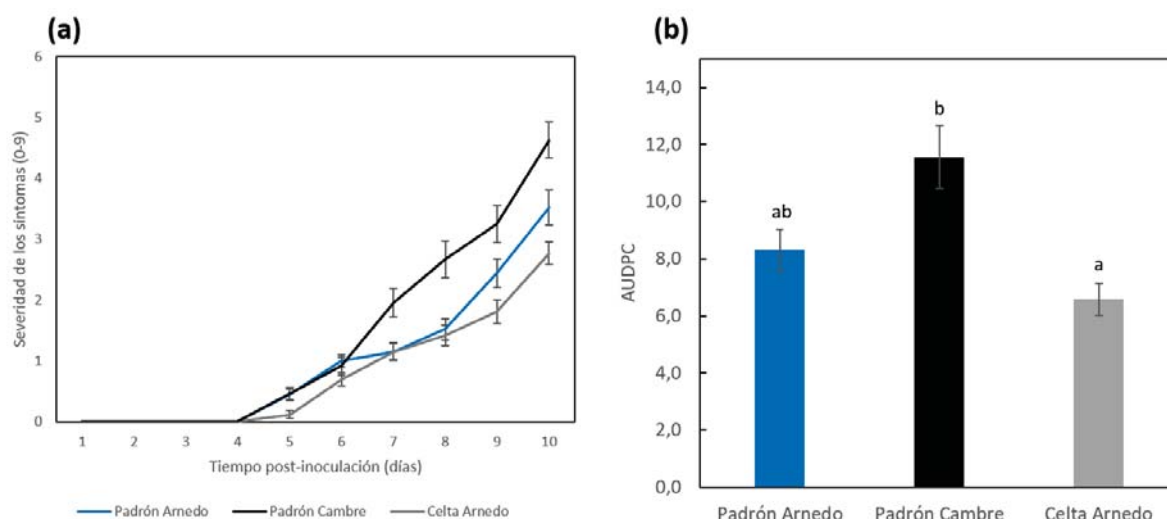


Figura 5. (a) Curvas del progreso de la enfermedad en los 10 primeros días tras la inoculación con *P. capsici*. Para cada día, los datos que se representan son la media de la severidad de los síntomas de cada línea \pm el error estándar. (b) Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) a los 10 días tras la inoculación. Los datos que se muestran son la media del AUDPC \pm el error estándar. Los grupos que no comparten la misma letra exhibieron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Kruskal-Wallis y posterior test de Bonferroni ($\alpha=0,05$).

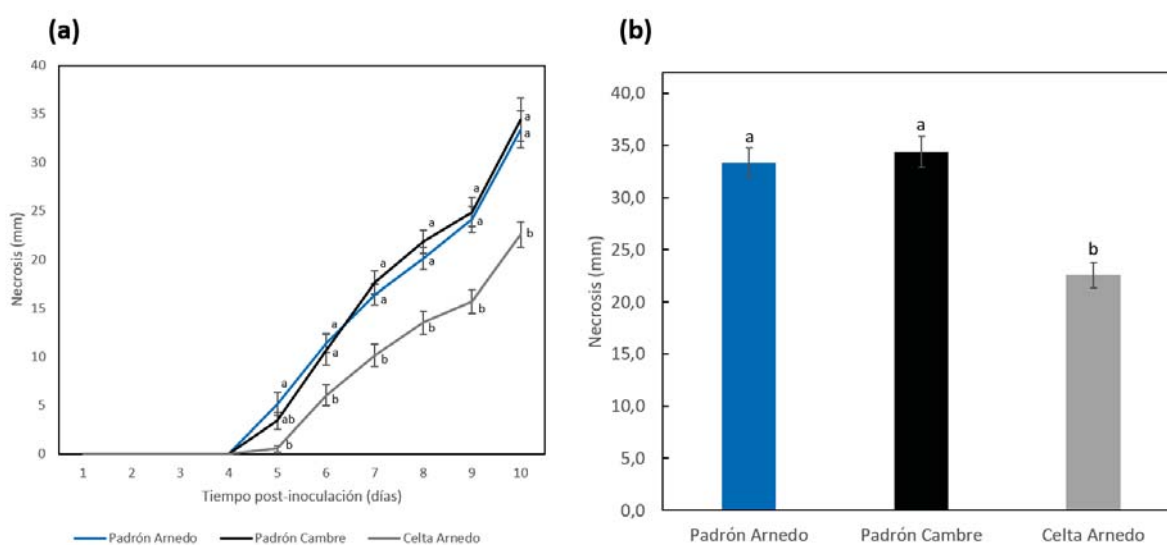


Figura 6. (a) Curvas del progreso de la necrosis del tallo a lo largo de los 10 días que duraron los experimentos. Los datos que se presentan son la media de la longitud de la lesión necrótica (mm) de cada línea \pm el error estándar. (b) Diagrama donde se muestra la media de la longitud de la necrosis \pm el error estándar al final de los experimentos. Los grupos que no comparten la misma letra exhibieron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Kruskal-Wallis y posterior test de Bonferroni ($\alpha=0,05$).

Otro parámetro que se tuvo en cuenta para determinar la resistencia a la enfermedad en la planta huésped fue la longitud de la necrosis del tallo. En la Figura 6a se representa las curvas del progreso de la necrosis. En el día 5 post-inoculación es el primer día que se manifestaron los síntomas en las plantas. En este día solo se observaron diferencias significativas entre las líneas

Padrón Arnedo y Celta Arnedo. No obstante, a partir del quinto día se apreció una tendencia similar, observando diferencias significativas entre la línea híbrida Celta y las líneas de pimiento de Padrón Arnedo y Cambre. Al final del experimento se observó el mismo patrón, las líneas Padrón Arnedo y Padrón Cambre no exhibieron diferencias significativas entre ellas, alcanzando unos valores similares, pero sí mostraron diferencias significativas con respecto a la línea Celta Arnedo, en la que los síntomas avanzaron más lentamente en todo el experimento (Figura 6a) y en particular al final del mismo (Figura 6b).

4.2 Expresión génica relativa los genes de defensa en las diferentes líneas

Se analizó la expresión génica relativa de 4 genes de defensa que codifican para una peroxidasa (*CaPOI*), una proteína de la familia PR-1 (*CaBPRI*), la enzima aminociclopropano 1-carboxilato oxidasa (*CaACO*) implicada en la formación de etileno y la enzima sesquiterpeno ciclasa implicada en la formación de la fitoalexina capsidiol (*CaSCI*). El análisis de expresión se llevó a cabo en las raíces de las plantas inoculadas y sin inocular transcurridas 24 horas tras la inoculación. En los diferentes genes, podemos observar patrones de expresión diferentes.

Con respecto a la expresión del gen *CaPOI*, solo se apreciaron diferencias significativas entre las plantas pertenecientes a las diferentes líneas (p-valor en la prueba ANOVA de 0,0022). Al realizar la prueba de múltiples rangos se observó que estas diferencias se producen entre las diferentes líneas. De esta forma, se puede apreciar que la línea Padrón Cambre exhibió niveles bajos de expresión de este gen, la línea Padrón Arnedo niveles medios y la línea Celta Arnedo sobreexpresó este gen. Los mayores niveles de expresión fueron alcanzados en las plantas de la línea Celta Arnedo sin inocular e inoculadas, obteniendo un nivel de expresión 2,0 y 2,5 veces superior a las plantas empleadas como control (Figura 7a). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas sin inocular e inoculadas.

En el caso del gen *CaBPRI*, no se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión relativa entre las plantas inoculadas y sin inocular (p-valor en la prueba ANOVA de 0,0807) (Figura 7b). No obstante, sí se apreciaron diferencias significativas entre las diferentes líneas (p-valor en la prueba ANOVA de 0,0171). Estas diferencias se produjeron entre la línea Celta Arnedo y las dos líneas de pimiento de Padrón Cambre y Arnedo (Figura 7b). La línea Celta Arnedo alcanzó un nivel de expresión 6,5 veces superior al control.

En el gen *CaACO* no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas y sin inocular ni entre las plantas de las diferentes líneas (p-valores en la prueba ANOVA de 0,7819 y 0,0967 respectivamente). A pesar de no existir un apoyo estadístico que

evidencia diferencias en las plantas tras la inoculación del patógeno, se puede apreciar en el gráfico un valor ligeramente superior en las plantas inoculadas.

En el caso del gen *CaSC*, se apreciaron diferencias significativas en el nivel relativo de expresión entre las plantas inoculadas y sin inocular y entre las plantas de las diferentes líneas (p-valores en la prueba ANOVA de 0,0414 y 0,0077 respectivamente). La prueba de rangos múltiples sugiere que las diferencias se producen entre las líneas Padrón Arnedo y Padrón Cambre con Celta Arnedo. El mayor valor de expresión del gen fue obtenido en las plantas de la línea Celta Arnedo inoculadas, alcanzando una expresión 2 veces superior a su control no inoculado.

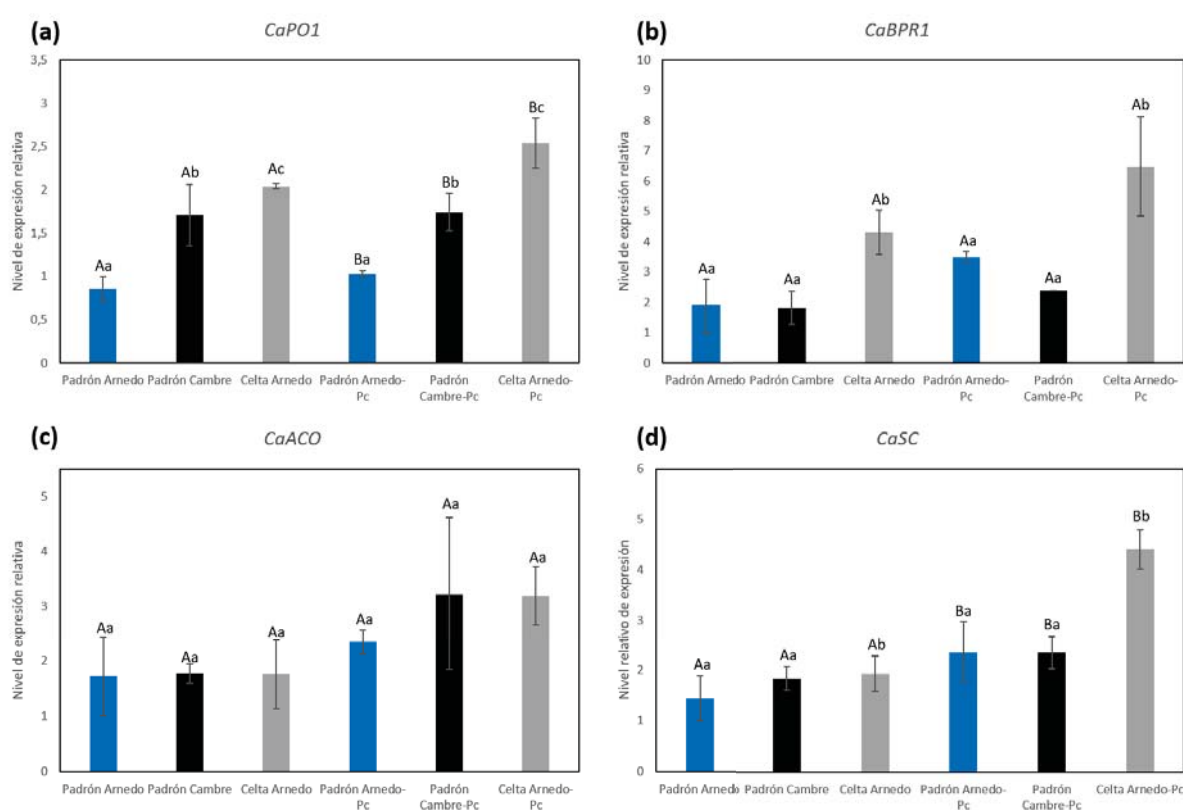


Figura 7. Niveles relativos de expresión de genes relacionados con la defensa en las raíces en diferentes líneas de *Capsicum annuum*. (a) una peroxidasa, (b) una proteína PR-1, (c) aminociclopropano 1-carboxilato oxidasa y (d) sesquiterpeno ciclasa. Los datos que se presentan son la media de los valores relativos de expresión \pm el error estándar. Se ha empleado la prueba ANOVA de dos vías la prueba Student-Newman-Keuls para comparar dos a dos las diferencias entre las variedades. Los grupos que no comparten la misma letra mayúscula exhibieron deferencias significativas entre las plantas inoculadas y sin inocular. Los grupos que no comparten la misma letra minúscula mostraron diferencias significativas con respecto a las distintas variedades.

4.3 Evaluación de fenoles solubles en las diferentes líneas

La determinación de los niveles de fenoles se realizó para detectar posibles compuestos involucrados en la defensa de la planta (fitoalexinas y fitanticipinas) o posibles patrones de lignificación.

El análisis estadístico concluyó que no existen diferencias significativas en el contenido de fenoles solubles totales ni entre las diferentes líneas ni entre plantas sin inocular e inoculadas (*p*-valores en la prueba de ANOVA de dos vías de 0,3196 y 0,3083 respectivamente). A pesar de esto, se puede percibir un aumento en la cantidad de fenoles tras la inoculación en las líneas de pimiento de Padrón Arnedo y Padrón Cambre. En el caso de la línea híbrida, tras la infección se observa una reducción en el contenido de fenoles libres (Figura 8).

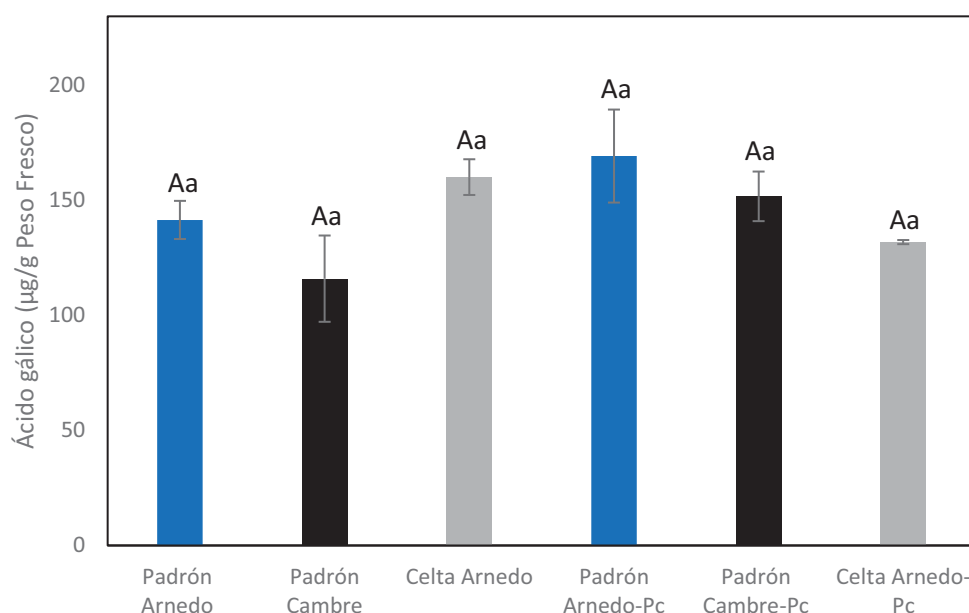


Figura 8. Contenido de fenoles solubles totales en las distintas líneas. Los datos se presentan en forma de media \pm error estándar. Se ha empleado la prueba ANOVA de dos vías y la prueba Student-Newman-Keuls para comparar dos a dos las diferencias entre las líneas. Los grupos que no comparten la misma letra mayúscula exhibieron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y sin inocular. Los grupos que no comparten la misma letra minúscula mostraron diferencias significativas con respecto a las distintas líneas.

5. DISCUSIÓN

La casa de semillas Ramiro Arnedo comercializa, además de una línea de pimiento de Padrón, un híbrido F1 entre Padrón y otra variedad. Dicho híbrido se comercializa con el nombre de Celta. En el año 2018 se aprobó la comercialización de este cultivo (O. APA/1232/2018, de 6

de noviembre), de hecho, Díaz (2020) reportó la presencia en el mercado del fruto proveniente de esta variedad. Por otra parte, en A Agraria se mantiene una línea de pimiento de Padrón conocida localmente como “Cambre”. Las líneas de Padrón Cambre y el híbrido Celta no pican (no presentan capsicina), mientras que la línea de Padrón de Ramiro Arnedo sí. La resistencia de dos líneas puras de pimiento de Padrón y de la línea híbrida fue evaluada en el presente trabajo mediante experimentos de inoculación en invernadero. Debido a que la capsicina es un compuesto cuya presencia en la planta desempeña un papel en la defensa contra hongos verdaderos y oomicetes (Veloso et al., 2014), cabía esperar que el cultivar de pimiento de Padrón de Ramiro Arnedo tuviera una mayor resistencia al ataque de *Phytophthora capsici*. No obstante, los bioensayos sugieren que la línea híbrida posee mayor resistencia a la infección (Figuras 5, 6).

Agricultores de todo el mundo sufren pérdidas económicas cada año debido a enfermedades causadas por *P. capsici*. Tradicionalmente se empleaban fungicidas para tratar a estas enfermedades; no obstante, puede resultar una práctica poco efectiva debido a la capacidad de producción de estructuras de resistencia (oosporas), la presencia de razas resistentes a estos químicos y la ausencia de variedades resistentes comercialmente aceptables (Granke et al., 2012). Es por esto que muchos investigadores ponen sus esfuerzos en evaluar la resistencia de diferentes líneas comerciales de pimiento frente a *P. capsici*. Parada-Rojas & Quesada-Ocampo (2019) evaluaron la resistencia de 22 líneas comerciales de pimiento frente a diferentes aislados de *P. capsici*. En los experimentos de invernadero no se detectaron síntomas hasta el quinto día post-inoculación y la muerte de las plantas no se manifestó hasta el día 12 tras la inoculación. Estos resultados concuerdan con las observaciones de este trabajo, en el cual los dos experimentos independientes se llevaron a cabo en invernadero y los síntomas no se manifestaron hasta el quinto día del ensayo (Figura 5a). Además, no se detectaron plantas muertas al final del experimento (día 10 post-inoculación), probablemente debido a que no transcurrió el tiempo suficiente. Con la finalidad de obtener líneas de pimiento comerciales resistentes a *P. capsici*, se produce la hibridación de estas líneas de interés agroalimentario con líneas resistentes (Gisbert et al., 2010; Walker & Bosland, 1999; Wyatt et al., 2013). En un estudio se determinó la resistencia al patógeno de líneas híbridas de pimiento creadas a partir de dos líneas parentales (*Keystone* y *Early Jalapeño*) y una resistente (SCM334) (Walker & Bosland, 1999). Las dos líneas híbridas resultaron resistentes tanto a la pudrición de la raíz y como a la infección en las hojas. Wyatt et al., (2013) evaluaron la resistencia de líneas híbridas F1, resultado de la hibridación de dos líneas comerciales con diferentes líneas resistentes. Las

líneas híbridas resultaron altamente tolerantes, no observando diferencias significativas con el parental resistente; mientras que los parentales comerciales alcanzaron un valor alto de AUDPC, resultando significativamente menos resistentes que las líneas híbridas. En el caso del presente estudio, la línea híbrida sería la línea Celta, mientras que el parental comercial sería Padrón Arnedo. En dichas líneas no se apreciaron diferencias significativas en valor de AUDPC, pero si en la longitud de la necrosis, resultando significativamente más baja en la línea híbrida. Por lo tanto, este aumento de la resistencia puede ser proporcionado por la otra línea parental.

En este trabajo se evaluó cuáles eran los mecanismos moleculares que llevan a una mayor resistencia de las plantas de la línea híbrida.

En estudios previos se analizó el perfil de expresión de los genes *CaPO1* y *CaBPR1* en cultivares de *Capsicum annuum* con diferente resistencia/susceptibilidad a *Phytophthora capsici*, permitiendo conocer el papel de estos genes en la defensa de la planta contra este oomicete patógeno. En esos estudios se obtuvo una expresión baja de los genes *CaPO1* y *CaBPR1* en los cultivares más susceptibles y moderadamente susceptibles al patógeno y una sobreexpresión en aquellos cultivares que mostraban una mayor resistencia (Silvar et al., 2008; Zhang et al., 2013). La expresión de estos dos genes puede emplearse como indicativo de la resistencia de la planta de pimiento. Por lo tanto, una expresión elevada de estos genes en los cultivares examinados en este trabajo, pueden indicar una mayor resistencia a *Phytophthora*.

Otros trabajos confirman también el papel de estos genes en la defensa frente al patógeno. Tras la inoculación de un cultivar de pimiento con dos razas de *P. capsici* que muestran interacción compatible e incompatible, los genes *CaPO1* y *CaBPR1* se sobreexpresaron en ambos tipos de interacción, resultando mayor en la interacción incompatible (Wang et al., 2013). La expresión de estos genes relacionados con la defensa fue evaluada bajo la influencia de tratamientos con calor, *P. capsici* y la combinación de ambos tratamientos (Lu et al., 2017). Se apreció una sobreexpresión de los genes por la influencia de la inoculación, pero se observó una sobreexpresión mayor producida por la combinación de los dos factores.

Numerosos estudios han demostrado que los genes *CaPO1* y *CaBPR1* se sobreexpresan en la planta del pimiento tras la inoculación con el *P. capsici* y normalmente esta sobreexpresión es mayor en las hojas que en las raíces (Silvar et al., 2008; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2013). Este patrón de expresión fue observado también para el gen *CaSC* (Silvar et al., 2008). No obstante, los análisis de expresión de este trabajo no parecen coincidir al completo. En el caso

del gen *CaPO1*, la expresión no difirió significativamente entre los cultivares inoculados y sin inocular (Figura 7a). Zhang et al. (2013) observaron un pico en la expresión de la peroxidasa *CaPO1* en las raíces de las plantas entre las 48-72 horas tras la inoculación con *P. capsici*. Es probable que en este estudio no se apreciaran diferencias entre las plantas inoculadas y sin inocular a las 24 horas debido a una respuesta tardía en la expresión de este gen. En el caso del gen *CaBPRI*, en las líneas Arnedo y Celta se observó un ligero incremento de la expresión a pesar de no contar con el apoyo estadístico (Figura 7b). Si se presta atención al gen *CaSC*, los estadísticos sugirieron diferencias significativas entre en las plantas tras la inoculación, pudiendo apreciarse un incremento de la expresión tras la infección en los 3 cultivares (Figura 7d).

Las peroxidasas están implicadas en diversas respuestas de la planta frente a estreses bióticos y abióticos. Las peroxidasas median el estallido oxidativo en diferentes interacciones planta-patógeno y suelen localizarse en la pared celular (Torres, 2010). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por estas enzimas actúa como una señal difusible que conduce a la muerte celular programada durante la respuesta hipersensible (Almagro et al., 2009). Se ha comprobado que la expresión del gen de la peroxidasa *CaPO1* y otros genes similares a peroxidasas en las interacciones *Capsicum*-patógeno, pueden estar relacionados con la acumulación de H_2O_2 del estallido oxidativo durante respuesta hipersensible; así como con la muerte celular programada o el desarrollo de la enfermedad (Do et al., 2003). En un trabajo donde se inoculan diferentes concentraciones de zoosporas de *P. capsici* en cultivares de pimiento susceptibles y resistentes, se observa un incremento de la actividad peroxidasa en hojas y tallos en los diferentes cultivares a diferentes concentraciones de zoosporas (Koç & Üstün, 2012). Sus resultados sugieren que el incremento de la actividad peroxidasa es una reacción general en respuesta a la inoculación, generándose necrosis en la región de la infección para bloquear el avance del patógeno (Koç & Üstün, 2012). En los resultados del presente trabajo, se pudo observar una mayor expresión de *CaPO1* en la línea Celta Arnedo (Figura 7a). A su vez, también se apreció una menor longitud de lesión en el tallo de las plantas de la línea Celta inoculadas (Figura 6). Estos resultados se pueden explicar debido a que las plantas de la línea Celta expresan de manera constitutiva mayor cantidad de peroxidasa, de forma que, ante una infección, puedan responder eficazmente desencadenando el estallido oxidativo e induciendo la respuesta hipersensible. Este sistema de defensa contra este patógeno solamente sería efectivo en la etapa inicial de la infección, ya que se trata de un organismo hemibiotrofo. Aparte de la función señalizadora del H_2O_2 , cabe destacar su efecto citotóxico. Por lo tanto, los

resultados obtenidos también pueden ser explicados por una mayor producción de especies reactivas de oxígeno por parte de las peroxidasas que causen un daño al patógeno e impidan su avance.

Como ya se comentó con anterioridad, la expresión de *CaPOI* puede emplearse como indicativo de la resistencia de la planta a enfermedades. En ese sentido, se observó una sobreexpresión de la enzima en la línea Celta Arnedo, una expresión intermedia en la línea Padrón Arnedo y una expresión baja o basal en la línea Padrón Cambre (Figura 7a). Si se presta atención a la AUDPC de los síntomas (Figura 5), se observó que la línea Celta Arnedo mostró un menor valor de AUDPC, la línea Padrón Arnedo un valor intermedio y la línea Padrón Cambre un valor alto. Por lo tanto, se puede asociar la expresión de este gen con la resistencia a *P. capsici*.

La lignificación es otra función de las peroxidasas que se debe tener en cuenta a la hora comprender el papel de estas enzimas en la defensa de la planta. Este proceso implica la oxidación de monolignoles (compuestos fenólicos) en la pared celular que luego reaccionan entre sí para producir el heteropolímero de lignina (Smirnoff & Arnaud, 2019). La formación de estos radicales monolignol es llevada a cabo por peroxidasas tipo de III como la codificada por el gen *CaPOI*. En trabajos donde elicitaron cultivos celulares de variedades de pimiento con diferente susceptibilidad al patógeno con micelio liofilizado y filtrado de *Phytophthora*, se observó una mayor acumulación de peroxidasas en el medio extracelular y en la pared celular, acompañado de una lignificación 3 veces superior en las plantas más resistentes con respecto a la más susceptible (Egea et al., 2001). En cuanto a la cantidad de compuestos fenólicos solubles, se observó una mayor acumulación en las hojas y los tallos de plantas inoculadas con respecto a los controles; mientras que en las raíces, las plantas controles mostraban un mayor contenido en fenoles libres que las plantas inoculadas (Gayoso et al., 2004; Koç & Üstün, 2012). Koç & Üstün (2012) entienden este desajuste en el patrón del contenido de fenólico de las raíces como consecuencia de un daño o necrosis en el tejido producido por la infección. Los datos de este trabajo concuerdan parcialmente con estas observaciones. En el caso del cultivar Celta Arnedo, se apreció una reducción del contenido de fenoles en las plantas tratadas con *P. capsici* (Figura 8). Puesto que los niveles más altos de expresión de la peroxidasa se produjeron en este cultivar (Figura 7a), se conjetura que esta disminución en el contenido de fenoles se debe a una mayor lignificación en el tejido vascular de estas plantas, con la finalidad de resistir al ataque del patógeno. Esto se correlaciona con el hecho de que las plantas de la línea Celta Arnedo mostraron una mayor resistencia (Figura 5, 6). García et al. (2018) ya observaron una

correlación entre la resistencia de pimiento a *P. capsici* y unos mayores niveles de lignificación, actividad peroxidasa y expresión de *CaPO1*.

Se han realizado experimentos donde se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos en la necrosis de los tallos de un cultivar de *C. annuum* resistente a *P. capsici* (Candela et al., 1995). Se identificaron tanto compuestos precursores de ligninas como compuestos fenólicos que muestra un efecto tóxico en el oomicete, lo cual refleja una función dual de este tipo de compuestos. El efecto inhibitorio de los fenoles puede explicar el aumento del contenido en fenoles solubles observado en las líneas de Padrón Arnedo y Padrón Cambre (Figura 8) como un mecanismo de defensa frente al patógeno.

La inducción de la expresión de proteína PR-1 tras la inoculación con *Phytophthora* es un fenómeno ampliamente descrito. El papel oomicida de esta proteína fue muy discutido desde su descubrimiento. La regulación positiva y la abundancia de las proteínas PR-1 durante la infección, combinada con su localización en el apoplasto, sugieren una función antimicrobiana (Breen et al., 2017). En los últimos años, se ha demostrado que la proteína PR-1 tiene la capacidad para unirse a esteroides de las membranas plasmáticas, causando un efecto inhibitorio en el crecimiento de los patógenos provocado por el secuestro de los esteroides (Gamir et al., 2017). Esto explica que los patógenos auxótrofos para el esteroide, como es el caso de los oomicetes del género *Phytophthora*, sean particularmente susceptibles a las proteínas PR-1. En este estudio, se han detectado diferencias significativas en la expresión génica de la proteína PR-1 entre los diferentes cultivares. Las plantas de la línea Celta Arnedo alcanzaron un nivel de expresión superior con respecto a las otras dos líneas de pimiento tipo Padrón (Figura 7b). Este hecho se puede relacionar con una menor longitud de la necrosis del tallo (Figura 6), sugiriendo un papel de la proteína PR-1 en la defensa activa de la planta frente al patógeno.

Las sesquiterpeno ciclasas son un grupo de enzimas involucradas en conversión del isoprenoide intermediario, el pirofosfato de farnesilo, en una gran variedad de sesquiterpenos cíclicos (Back et al., 1998). El capsidiol es la principal fitoalexina en la planta de pimiento y de tabaco (Maldonado-Bonilla et al., 2008). En estas plantas, la actividad enzimática de la sesquiterpeno ciclasa es la encargada de la producción de 5-epi-aristolóqueno, que supone el primer paso de la ruta de biosíntesis del capsidiol (Figura 4) (Maldonado-Bonilla et al., 2008). Se puede relacionar la expresión del gen *CaSC* con una mayor producción de capsidiol. Se realizaron diversos bioensayos con *P. capsici* donde se observó el papel del capsidiol como agente fungistático y fungitóxico (Egea et al., 1996a). Para que la planta resulte resistente a la

infección, se debe producir capsidiol por encima del nivel fungitóxico. Su eficacia está condicionada, en primer lugar, por la inducción *de novo* o activación de un precursor inactivo de las enzimas necesarias para sintetizar el capsidiol y, en segundo lugar, por la velocidad del mecanismo de transporte de la fitoalexina (Egea et al., 1996b). La expresión génica de esta enzima fue mayor en aquellas plantas con genotipo resistente a *Phytophthora*, por lo que se puede emplear como un indicador de la resistencia a este oomicete (Silvar et al., 2008). En este trabajo se apreciaron diferencias significativas en el nivel de expresión entre las plantas de las líneas Padrón Cambre y Padrón Arnedo con respecto a la línea Celta Arnedo (Figura 7d). Nuevamente, se observó un mayor número de transcritos en las plantas de la línea Celta Arnedo (Figura 7d), sugiriendo una mayor producción de la fitoalexina en las plantas de este cultivar. Probablemente exista una correlación entre la mayor producción de capsidiol y la mayor resistencia observada en los bioensayos (Figura 5, 6).

En un estudio donde inocularon con *P. capsici* cultivares de pimiento con diferente grado de resistencia, observaron que se producía una reacción hipersensible a lo largo del tallo que se acompañaba con una acumulación de la fitoalexina capsidiol (Egea et al., 1996a). Esta acumulación de capsidiol está inversamente relacionada con la invasión del oomicete y, cuanto mayor es la cantidad de capsidiol acumulada, menor es la longitud de la necrosis del tallo (Egea et al., 1996a). Este patrón se pudo apreciar en la línea Celta Arnedo, donde se observó una mayor resistencia a la infección. Los resultados de este trabajo mostraron en dicho cultivar una menor longitud de la necrosis (Figura 6) acompañado de una mayor expresión del gen que codifica para una enzima sesquiterpeno ciclase (Figura 7d). Es probable que se esté produciendo mayor cantidad de capsidiol en las raíces de las plantas de esta variedad, dificultando el crecimiento y avance de la enfermedad.

Una fitohormona involucrada en la resistencia al patógeno es el etileno. La biosíntesis del etileno se produce en dos pasos a partir de la S-adenosilmetionina. En un primer paso, la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) sintasa realiza la reacción de ciclación de la S-adenosilmetionina para formar el ACC. Posteriormente, la enzima ACC oxidasa cataliza la fragmentación oxidativa del ACC para formar el etileno (Zhang et al., 1995). Por lo tanto, se puede relacionar la expresión de la enzima ACC oxidasa con la formación de etileno. En plantas de pimiento tratadas con etefón (libera etileno cuando se hidroliza) e inoculadas con *P. capsici*, se observó una reducción de los síntomas de la enfermedad en el 30% de las plantas, indicando que la percepción de etileno es requerida para la resistencia frente al patógeno (Núñez-Pastrana et al., 2011). Se observó un descenso en el crecimiento del oomicete y en su capacidad para

penetrar en la planta, motivado probablemente por el incremento en la expresión de genes relacionados con la resistencia (Núñez-Pastrana et al., 2011). Los análisis de expresión de la ACC oxidasa en el presente estudio mostraron un ligero incremento en la expresión de la enzima en las tres líneas tras la inoculación (Figura 7c). No obstante, las pruebas estadísticas realizadas no detectaron diferencias significativas ni entre las líneas ni entre plantas inoculadas y no inoculadas. Esto podría indicar que el etileno no tiene un papel muy relevante en los mecanismos de defensa frente a *P. capsici* en estas líneas evaluadas.

Diversos estudios trataron de evaluar el papel de los factores de respuesta al etileno *CaAP2/ERF064* y *CaPTI* en la resistencia del pimiento frente a *P. capsici* (Jin et al., 2019; Jin et al. 2016). La transcripción de ambos factores parece estar regulada por la vía de señalización del etileno. Cuando se silencian estos factores de transcripción, se reduce la expresión de diferentes genes relacionados con la defensa, entre los que se incluye *CaBPR1* (Jin et al., 2019; Jin et al. 2016). Estos resultados sugieren un papel del etileno y de estos factores de transcripción en la defensa de la planta mediante la expresión de la proteína PR-1. En nuestro trabajo, no se encontró una relación clara entre el patrón de expresión de la enzima ACC oxidasa con la expresión de proteína PR-1. Probablemente se deba a que no transcurrió el tiempo suficiente en 24 horas para percibir los efectos de esta fitohormona.

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS

En el presente estudio se pueden extraer una serie de conclusiones:

- La línea Celta de Ramiro Arnedo (híbrida) mostró mayor resistencia a *P. capsici* que las dos líneas puras de pimiento de Padrón.
- La mayor resistencia observada en la línea Celta puede ser debida a una mayor expresión de los genes *CaPO1*, *CaBPR1* y *CaSC*. Esto sugiere que el cultivar Celta de Ramiro Arnedo posee unos mecanismos que le permiten responder de forma más rápida y eficaz a la infección. La expresión de *CaACO* sugiere un papel poco importante del etileno en la defensa contra *P. capsici*.

No presente estudo pódense extraer unha serie de conclusións:

- A liña Celta de Ramiro Arnedo (híbrida) amosou unha maior resistencia fronte a *P. capsici* que as dúas liñas puras de pemento de Padrón.

- A maior resistencia observada na liña Celta pode ser debida a unha maior expresión dos xenes *CaPO1*, *CaBPR1* y *CaSC*. Isto suxire que o cultivar Celta de Ramiro Arnedo posúe mecanismos que lle permiten responder de forma máis rápida á infección. A expresión de *CaACO* suxire un papel pouco importante do etileno na defensa contra *P. capsici*.

The conclusions drawn from this work are:

- Ramiro Arnedo's Celta line (hybrid) showed higher resistance against the pathogen *P. capsici* than the two pure lines of Padrón pepper.
- The higher resistance observed in the Celta line can be due to a higher expression of the genes *CaPO1*, *CaBPR1* and *CaSC*. Ramiro Arnedo's Celta cultivar possesses mechanisms that allow it to respond more quickly and efficiently to infection. *CaACO* expression suggests a minor role of ethylene in defence against *P. capsici*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399–451. doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90. doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377–390. doi.org/10.1093/jxb/ern277
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes*, 9(7). doi.org/10.3390/genes9070339
- Back, K., He, S., Kim, K. U., & Shin, D. H. (1998). Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant and Cell Physiology*, 39(9), 899–904. doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029452
- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences.

- Molecular Plant Pathology*, 20(8), 1163–1178. doi.org/10.1111/mpp.12821
- Barchenger, D. W., Lamour, K. H., & Bosland, P. W. (2018). Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 9(May), 1–16. doi.org/10.3389/fpls.2018.00628
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., & Sekimoto, S. (2012). The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi.” *Protoplasma*, 249(1), 3–19. doi.org/10.1007/s00709-011-0269-2
- Bernal Pita da Veiga, M. A. (1993). *Estudio del polimorfismo isoenzimático en el pimiento de Padrón, Capsicum annuum L. var. annuum, a lo largo del desarrollo*. Tesis doctoral. Universidad de A Coruña.
- Bizuneh, G. K. (2021). The chemical diversity and biological activities of phytoalexins. *Advances in Traditional Medicine*, 21(1), 31–43. doi.org/10.1007/s13596-020-00442-w
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M., & Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45(3), 266–277. doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.010
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546. doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938
- Boevink, P. C., Birch, P. R. J., Turnbull, D., & Whisson, S. C. (2020). Devastating intimacy: the cell biology of plant–*Phytophthora* interactions. *New Phytologist*, 228(2), 445–458. doi.org/10.1111/nph.16650
- Breen, S., Williams, S. J., Outram, M., Kobe, B., & Solomon, P. S. (2017). Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends in Plant Science*, 22(10), 871–879. doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.013
- Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Chichester: Wiley Blackwell.
- Campbell C. L., Madden L. V., 1990) *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York, USA: John Wiley.
- Candela, M. E., Alcázar, M. D., Espín, A., Egea, C., & Almela, L. (1995). Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 44(1), 116–123. doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02723.x

- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803–814. doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008
- Comisión Europea. Reglamento (CE) 510/2006 del Consejo, sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 18 de diciembre de 2009, pp. 51-56
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341(6147), 746–751. doi.org/10.1126/science.1236011
- Díaz, P. (2020). Calidad y conservación de fruto de pimiento de Padrón presente en el mercado en el período Abril-Mayo 2020. Universidad de A Coruña. Trabajo de Fin de Grado.
- De Wit, P. J. G. M. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21), 2726–2732. doi.org/10.1007/s00018-007-7284-7
- Do, H. M., Hong, J. K., Jung, H. W., Kim, S. H., Ham, J. H., & Hwang, B. K. (2003). Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(3), 196–205. doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.3.196
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539–548. doi.org/10.1038/nrg2812
- Egea, C., Ahmed, A. S., Candela, M., & Candela, M. E. (2001). Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 158(2), 151–158. doi.org/10.1078/0176-1617-00079
- Egea, C., Alcázar, M. D., & Candela, M. E. (1996a). Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum*, 98(4), 737–742. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb06679.x
- Egea, C., Pérez, M. D. G., & Candela, M. E. (1996b). Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 149(6), 762–764. doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80104-0
- España. Orden APA/1232/2018, de 6 de noviembre, por la que se dispone la renovación de la inscripción de diversas variedades de distintas especies en el Registro de Variedades Comerciales. Boletín Oficial del Estado, 22 de noviembre del 2018, núm. 282, pp. 113695-113700.

- Gamir, J., Darwiche, R., van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneider, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant Journal*, 89(3), 502–509. doi.org/10.1111/tjp.13398
- García, T. (2018). *Analysis of capsinoids in Galician pepper cultivars and characterization of their properties for plant protection*. Tesis doctoral. Universidad de A Coruña.
- García, T., Lois, M., Veloso, J., Díaz, J. (2015). Induced resistance in pepper against *Phytophthora capsici* by vanillyl nonanoate, a Fo47 crude elicitor and a Bacillus-based product. XXI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y XIV Congreso Hispanoluso de Fisiología Vegetal. Toledo (Spain). Póster.
- García, T., Veloso, J., & Díaz, J. (2018). Vanillyl nonanoate induces systemic resistance and lignification in pepper plants. *Journal of Plant Physiology*, 231, 251–260. doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.002
- Gayoso, C., Pomar, F., Merino, F., & Bernal, M. A. (2004). Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. annuum infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae*, 102(1), 1–13. doi.org/10.1016/j.scienta.2003.11.015
- Gayoso, Carmen, De Ilárduya, O. M., Pomar, F., & Merino, F. (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 118(3), 199–209. https://doi.org/10.1007/s10658-007-9134-8
- Gisbert, C., Sánchez-Torres, P., Raigón, M. D., & Nuez, F. (2010). *Phytophthora capsici* resistance evaluation in pepper hybrids: Agronomic performance and fruit quality of pepper grafted plants. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8(1), 116–121.
- Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L., Lamour, K., & Hausbeck, M. K. (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease*, 96(11), 1588–1600. doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0211-FE
- Hückelhoven, R. (2008). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45(February 2007), 101–127. doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094325
- Hückelhoven, R. (2014). The effective papilla hypothesis. *New Phytologist*, 204(3), 438–440. https://doi.org/10.1111/nph.13026

- Jeandet, P. (2015). Phytoalexins: Current progress and future prospects. *Molecules*, 20(2), 2770–2774. doi.org/10.3390/molecules20022770
- Jeandet, P., Clément, C., Courrot, E., & Cordelier, S. (2013). Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14136–14170. doi.org/10.3390/ijms140714136
- Jin, J. H., Zhang, H. X., Ali, M., Wei, A. M., Luo, D. X., & Gong, Z. H. (2019). The CaAP2/ERF064 regulates dual functions in pepper: Plant cell death and resistance to *Phytophthora capsici*. *Genes*, 10(7). doi.org/10.3390/genes10070541
- Jin, J. H., Zhang, H. X., Tan, J. Y., Ming-Jia, Y., Li, D. W., Khan, A., & Gong, Z. H. (2016). A new ethylene-responsive factor CaPTI1 gene of pepper (*Capsicum annuum* L.) involved in the regulation of defense response to phytophthora capsici. *Frontiers in Plant Science*, 6(JAN2016), 1–12. doi.org/10.3389/fpls.2015.01217
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. doi.org/10.1038/nature05286
- Judelson, H. S., & Blanco, F. A. (2005). The spores of Phytophthora: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 47–58. doi.org/10.1038/nrmicro1064
- Kang, S. (2016). *Phytophthora Database*. Obtenido de Phytophthora Database: www.phytophthoradb.org/
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D. G., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413–434. doi.org/10.1111/mpp.12190
- Koç, E., & Üstün, A. S. (2012). Influence of *Phytophthora capsici* L. inoculation on disease severity, necrosis length, peroxidase and catalase activity, and phenolic content of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Turkish Journal of Biology*, 36(3), 357–371. doi.org/10.3906/biy-1109-12
- Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., De Cock, A. W. A. M., & Govers, F. (2012). The genus Phytophthora anno 2012. *Phytopathology*, 102(4), 348–364. doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0025
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329–337. doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x

- Leonian, L. H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, 12(9).
- Lu, J., Guo, M., Zhai, Y., Gong, Z., & Lu, M. (2017). Differential Responses to the Combined Stress of Heat and *Phytophthora capsici* Infection Between Resistant and Susceptible Germplasms of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 161–173. doi.org/10.1007/s00344-016-9627-9
- Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, 54(2), 263–272. doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028
- Maldonado-Bonilla, L. D., Betancourt-Jiménez, M., & Lozoya-Gloria, E. (2008). Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 439–449. doi.org/10.1007/s10658-007-9262-1
- Mishra, A. K., Sharma, K., & Misra, R. S. (2012). Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*, 7(2), 95–120. doi.org/10.1080/17429145.2011.597517
- Núñez-Pastrana, R., Arcos-Ortega, G. F., Souza-Perera, R. A., Sánchez-Borges, C. A., Nakazawa-Ueji, Y. E., García-Villalobos, F. J., Zúñiga-Aguilar, J. J. (2011). Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 131(4), 669–683. doi.org/10.1007/s10658-011-9841-z
- Parada-Rojas, C. H., & Quesada-Ocampo, L. M. (2019). Characterizing Sources of Resistance to Phytophthora Blight of Pepper Caused by *Phytophthora capsici* in North Carolina. *Plant Health Progress*, 20(2), 112–119. https://doi.org/10.1094/php-09-18-0054-rs
- Parisi, M., Alioto, D., & Tripodi, P. (2020). Overview of biotic stresses in pepper (*Capsicum* spp.): Sources of genetic resistance, molecular breeding and genomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). doi.org/10.3390/ijms21072587
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45–e45
- Pontier, D., Balagué, C., & Roby, D. (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences - Serie III*, 321(9), 721–734. doi.org/10.1016/S0764-4469(98)80013-9
- Popova Irikova, T., Kintzios, S., Grozeva, S., & Rodeva, V. (2016). Pepper (*Capsicum annuum* L.)

- anther culture: Fundamental research and practical applications. *Turkish Journal of Biology*, 40(4), 719–726. doi.org/10.3906/biy-1506-79
- Rafiqi, M., Bernoux, M., Ellis, J. G., & Dodds, P. N. (2009). In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(9), 1017–1024. doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.04.010
- Ristaino, J. B., & Johnston, S. A. (1999). Ecologically based approaches to management of phytophthora blight on bell pepper. *Plant Disease*, 83(12), 1080–1087. doi.org/10.1094/pdis.1999.83.12.1080
- Rodriguez Bao, J. M., Riveiro Leira, M., & Terrén Povés, L. (2006). Selección de pimientos autóctonos de Galicia. 502-505.
- Rodriguez Bao, J., Riveiro Leira, M., & Pérez Fontelo, P. (2007). El cultivo del pimiento en Galicia. *Seminario de Especialistas en Horticultura*, 357-370.
- Rodríguez Bao, J., Terrén Povés, L., & Ferreiro Fandiño, J. (2004a). Selección de pimientos autóctonos de Galicia: 1995-2003. 261-277.
- Rodriguez Bao, J., Terrén Povés, L., Rivera Martínez, A., Andrés Ares, J., & Fernández Paz, J. (2004b). Pimientos autóctonos. *Centro de Formación y Experimentación Agraria "Baixo Miño" (Pontevedra)*, 24-40.
- Sattler, S. E., & Funnell-Harris, D. L. (2013). Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: Strengthening the barrier against pathogens? *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–8. doi.org/10.3389/fpls.2013.00070
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A., & De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 941–950. doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011
- Shittu, H. O. (2019). Plants' Innate Defence Mechanisms Against Phytopathogens. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(2), 314–319. https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.314-319
- Silvar, C., Merino, F., & Díaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 165(10), 1120–1124. doi.org/10.1016/j.jplph.2007.11.008
- Singleton V. L. & Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197–1214. doi.org/10.1111/nph.15488
- Srivastava, A., & Mangal, M. (2019). *Capsicum Breeding: History and Development*. doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6_3
- Taboada Arias, A., Rivera Martínez, A., & Riveiro Leira, M. (2017). *Variedades autóctona de pementos de Galicia. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural*.
- Takahashi, S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., & Chappell, J. (2005). Kinetic and molecular analysis of 5-epiaristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylations of sesquiterpenes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3686–3696. https://doi.org/10.1074/jbc.M411870200
- Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414–429. doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x
- Tyler, B. M. (2002). Molecular basis of recognition between Phytophthora pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 137–167. doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120601.125310
- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: A dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1–6. doi.org/10.3389/fpls.2012.00085
- Van Der Hoorn, R. A. L., & Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, 20(8), 2009–2017. doi.org/10.1105/tpc.108.060194
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–162. doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- Veloso, J., Prego, C., Varela, M. M., Carballeira, R., Bernal, A., Merino, F., & Díaz, J. (2014). Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology*, 16(1), 177–185. doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00717.x
- Voigt, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*, 5(APR), 1–6. doi.org/10.3389/fpls.2014.00168
- Walker, S. J., & Bosland, P. W. (1999). Inheritance of phytophthora root rot and foliar blight resistance in pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(1), 14–18. doi.org/10.21273/jashs.124.1.14

- Walters, D. (2011). Plant defense: warding off attack by pathogens, herbivores, and parasitic plants. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Walters, D., Newton, A., & Lyon, G. (2014). Induced Resistance for Plant Defense. Chichester: Wiley Blackwell.
- Wang, J. E., Li, D. W., Zhang, Y. L., Zhao, Q., He, Y. M., & Gong, Z. H. (2013). Defence responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) infected with incompatible and compatible strains of *Phytophthora capsici*. *European Journal of Plant Pathology*, 136(3), 625–638. doi.org/10.1007/s10658-013-0193-8
- Wang, W., & Jiao, F. (2019). Effectors of Phytophthora pathogens are powerful weapons for manipulating host immunity. *Planta*, 250(2), 413–425. doi.org/10.1007/s00425-019-03219-x
- Wyatt, L. E., Dunn, A. R., Falise, M., Reiners, S., Jahn, M., Smart, C. D., & Mazourek, M. (2013). Red harvest yield and fruit characteristics of phytophthora capsici-resistant bell pepper inbred lines in New York. *HortTechnology*, 23(3), 356–363. doi.org/10.21273/horttech.23.3.356
- Xie, M., Zhang, J., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Chen, J. G., & Muchero, W. (2018). Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–9. doi.org/10.3389/fpls.2018.01427
- Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., & Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102030. doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030
- Zhang, Y. L., Li, D. W., Gong, Z. H., Wang, J. E., Yin, Y. X., & Ji, J. J. (2013). Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 3605–3621. doi.org/10.4238/2013.September.13.5
- Zhang, Z., Schofield, C. J., Baldwin, J. E., Thomas, P., & John, P. (1995). Expression, purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from tomato in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 307(1), 77–85. doi.org/10.1042/bj3070077
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345–351. doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004